Aus der Medizinischen Klinik der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. med. et. phil. S. J. Thannhauser)

Untersuchungen über den Stoffwechsel der Aminosäuren im Tierkörper

Habilitationsschrift

zur Erlangung der venia legendi für das Fach
der inneren Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

vorgelegt von

Dr. med. Hans Adolf Krebs

1 9 3 3

Verlag von WALTER DE GRUYTER & CO., Berlin und Leipzig

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderdruck aus
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, 217. Band (1933)

Druck von Metzger & Wittig in Leipzig 45

Die Versuche, über die ich in dieser Arbeit[1]) berichte, betreffen den Abbau der Aminosäuren im tierischen Organismus. Mit Hilfe neuer Methoden — dem Gewebeschnittverfahren von O. Warburg — habe ich besonders 2 Teilfragen des Gebietes untersucht.

Die erste ist die Frage nach dem Ort der Desaminierung der Aminosäuren im Tierkörper. Bisher war bekannt, daß in erster Linie die Leber Aminosäuren desaminiert. Unsere Versuche ergeben, daß die Desaminierung zum großen Teil — bei der Ratte sogar zum überwiegenden Teil — auch in der Niere erfolgt.

Die Desaminierung der Aminosäuren in der Niere ist ein notwendiger Teilprozeß bei Regulierung des Säurebasengleichgewichtes durch die Niere. Die Niere gebraucht das durch die Desaminierung frei werdende Ammoniak bei der Ausscheidung von überschüssigen fixen Säuren. Ist die Desaminierung der Aminosäuren in der Niere gestört — wie bei schweren Nierenkrankheiten, — so gerät der Organismus infolge des Fehlens von Ammoniak in der Niere in den Zustand der „Acidose". Die urämische „Acidose" ist nicht die Folge des Erlahmens der sekretorischen Funktionen, sondern Folge des Erlahmens der chemischen Leistungen der Niere, des Versagens der Ammoniakgewinnung aus Aminosäuren.

Die zweite Teilfrage, die ich untersucht habe, ist die Frage nach dem chemischen Mechanismus der Desaminierung. Das Ergebnis ist der Nachweis, daß der von Neubauer im Jahre 1909

---

[1]) Ausgeführt mit Unterstützung der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft, der Ella Sachs Plotz Foundation und der Rockefeller Foundation.

gefundene und besonders durch Versuche von Knoop erwiesene Weg der oxydativen Desaminierung allgemein für die Desaminierung der α-Aminosäuren zutrifft und praktisch der einzige Weg ist, den die Desaminierung der Aminosäuren im Tierkörper geht.

Es ließen sich die bei der oxydativen Desaminierung der Aminosäuren erwarteten Ketosäuren in einer Reihe von weiteren Fällen isolieren. Die Isolierung gelang auch bei solchen Ketosäuren, die den natürlichen aliphatischen α-Aminosäuren entsprechen und die bisher noch niemals aus den Aminosäuren erhalten waren. Bei denjenigen Ketosäuren, die mit den vorliegenden Methoden quantitativ bestimmbar sind, wurde die verschwundene Aminosäure quantitativ als Ketosäure wiedergefunden.

Ferner zeigte sich, daß nur in Anwesenheit und unter Verbrauch von Sauerstoff Aminosäuren in tierischen Geweben mit meßbarer Geschwindigkeit desaminiert werden. Durch diese Tatsache ist auch für solche Aminosäuren, deren Desaminierungsprodukte noch nicht isoliert werden konnten (Diaminosäuren, Aminodicarbonsäuren), bewiesen, daß sie allein oxydativ abgebaut werden.

Die Mitteilung der Versuche gliedert sich in folgende Abschnitte:

Seite

I. Methoden 193
1. Versuchslösung. — 2. Gewebe. — 3. Versuchsgefäße. — 4. Messung der Sauerstoffatmung. — 5. Bestimmung des Aminostickstoffes. — 6. Ammoniakbestimmung. — 7. Bestimmung der Ketosäuren; a) manometrische Methode; b) Isolierung der Ketosäuren. — 8. Messung des Aminosäurestoffwechsels; a) Aminostickstoff; b) Ammoniakbildung; c) Ketosäurebildung; d) Versuchszeit.

II. Ort der Desaminierung im Tierkörper 199

III. Einfluß der Aminosäurekonzentration auf die Desaminierungsgeschwindigkeit 202

IV. Desaminierung optisch aktiver Aminosäuren 203

V. Chemische Konstitution und Desaminierungsgeschwindigkeit . 204

VI. Desaminierung von Peptiden 205

VII. Harnstoffbildung aus Aminosäuren 207

VIII. Bildung von Ketosäuren aus Aminosäuren 210
1. Desaminierung unter anaeroben Bedingungen. — 2. Verhältnis von Sauerstoffverbrauch zu Ammoniakbildung. — 3. Überführung der Aminosäuren in die Ketosäuren.

IX. Ammoniakbildung aus Asparagin 222

X. Quelle des Harnammoniaks 223

XI. Bedeutung des Harnammoniaks 225

XII. Acidose der Nierenkranken 225

XIII. Zusammenfassung 227

I. Methoden.

Wie in früheren Arbeiten[1]) dienen als Versuchsobjekte überlebende Gewebschnitte nach Warburg[2]). Dünne Rasiermesserschnitte von etwa 2—20 mg Trockengewicht werden 1—2 Stunden in einer physiologischen Salzlösung in Gegenwart von Sauerstoff bewegt. Nach Ablauf der Versuchszeit wird die Versuchsflüssigkeit auf die Stoffwechselprodukte analysiert. Die allgemeinen Grundzüge der Methoden sind früher beschrieben[1]). Ich beschränke mich daher im folgenden auf einige besondere Angaben.

1. Versuchslösung: Versuchslösung ist teils die früher beschriebene[1]) „physiologische Salzlösung", teils eine ähnliche Salzlösung, die statt des Bicarbonats-Kohlensäurepuffers Phosphatpuffer enthält. [Vgl. [3])]. Die Verwendung dieser Lösung vereinfacht die Messung der Sauerstoffatmung. Die Atmungskohlensäure kann in Lauge absorbiert werden und der Sauerstoffverbrauch ergibt sich aus der Multiplikation der manometrisch gemessenen Druckänderung mit der „Gefäßkonstanten für Sauerstoff". Die Atmungsmessung ist in dieser Anordnung bequemer und genauer als die Atmungsmessung mit Gefäßpaaren, wie sie bei Benutzung einer Lösung von physiologischer Bicarbonatkonzentration nötig ist[2]).

Zur Herstellung der „Phosphatsalzlösung" wird außer den früher angegebenen[1]) Lösungen folgende Phosphatstammlösung bereitet: 40 ccm m/4-Na_2HPO_4 und 2ccm m/1-Salzsäure werden mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. p_H der Lösung ist 7,4. Man mischt 100 ccm 0,9%ige Kochsalzlösung, 4 ccm 1,15%ige Kaliumchloridlösung, 3 ccm 0,11 m-Calciumchloridlösung, 1 ccm 0,154 m-Magnesiumsulfatlösung und 21 ccm des Phosphatpuffers. Nach längerem Stehen treten in der Lösung, die in bezug auf Calciumphosphat übersättigt ist, Trübungen auf. Wir stellen sie daher für jeden Versuch frisch her. Unterschiede des Stoffwechsels der Aminosäuren in phosphat- oder bicarbonathaltiger Lösung habe ich bisher nicht gefunden.

Zusätze zur Versuchsflüssigkeit (Aminosäuren) gebe ich bei den einzelnen Versuchen an. Die Aminosäuren habe ich größtenteils von der Firma Hoffman-La-Roche bezogen, d,l-Phenylalanin, d,l-Leucin, d,l-Norleucin von der Firma Fränkel und Landau, Berlin-Oberschöneweide. l-Alanin, d-Asparaginsäure und d,l-Glutaminsäure verdanke ich der Freundlichkeit von Herrn Dr. Hermann O. L. Fischer-Basel. Die Substanzen wurden durch Bestimmung des Aminostickstoffes, des Schmelzpunktes und der spezifischen Drehung auf Reinheit geprüft.

2. Gewebe. Als Versuchsmaterial dienen vorwiegend Organe von Ratten. Zur Orientierung über die Frage, ob die an Ratten erhaltenen Ergebnisse allgemeiner gültig sind, habe ich einige Versuche mit Geweben von Kaninchen, Hunden, Katzen und Menschen angestellt. Für die Überlassung frischen menschlichen Operationsmaterials bin ich der Freiburger Chirurgischen Universitätsklinik (Prof. Rehn) zu großem Dank verpflichtet.

---

[1]) Krebs und Henseleit, Diese Z. **210**, 33 (1932).

[2]) Warburg, Stoffwechsel der Tumoren, Berlin, 1926.

[3]) Vgl. hierzu, Dickens, Biochemic. J. **24**, 1301 (1930). H. L. Alt, Biochem. Z. **221**, 498 (1930), ferner Warburg, a. a. O. S. 120.

Die Schnitte werden vor dem Versuch, wie früher beschrieben, zur Entfernung vorgebildeter auswaschbarer Stoffwechselprodukte kurz mit der Versuchsflüssigkeit gewaschen. Die Gewebemengen werden so groß gewählt, daß die Konzentrationsänderungen, die der Stoffwechsel in der Lösung erzeugt, mit genügender Genauigkeit gemessen werden können. Bei den meisten Geweben genügen Mengen von 5—15 mg Trockengewicht, selbst wenn nach einer Versuchszeit von 2 Stunden in der Lösung gleichzeitig mehrere Stoffe nebeneinander (Ammoniak, Aminostickstoff, Ketosäure) bestimmt werden sollen. Größere Gewebemengen, bis zu 500 mg Trockengewicht sind in solchen Versuchen nötig, in denen Ketosäuren als Di-nitrophenylhydrazone isoliert werden sollen.

Von einigen Geweben ist es nicht erforderlich, Schnitte herzustellen. Die Netzhaut ist als Ganzes hinreichend dünn. Für Versuche am quergestreiften Muskel benutzen wir das unzerschnittene Zwerchfell kleiner Ratten. Die Darmwand verwenden wir ebenfalls als Ganzes, da nach dem Abschaben der Schleimhaut von der Muskulatur der Stoffwechsel mit der Zeit gewöhnlich absinkt. Die Darmwand kleiner Ratten scheint für Stoffwechselversuche hinreichend dünn zu sein. Von Hoden verwenden wir die auseinandergezupften, aber noch zusammenhängenden Schläuche.

3. Versuchsgefäße: Für die Mehrzahl der Versuche benutzen wir Gefäße nach Warburg von der Form der Fig. in Diese Z. **210**, 40 (1932). In diesen Gefäßen können Sauerstoffatmung und Stoffwechsel der Aminosäuren gleichzeitig gemessen werden. Der Einsatz enthält 0,2 ccm n-Natronlauge zur Absorption der Atmungskohlensäure, der Hauptraum enthält 2,5 ccm Versuchslösung; der Gasraum enthält Sauerstoff von Atmosphärendruck. Soll die Atmung nicht gemessen werden, so verwenden wir die früher angegebene Apparatur[1]).

Für Versuche mit größeren Gewebe- und Flüssigkeitsmengen, besonders für die Isolierung der Ketosäuren, benutzen wir Gefäße von der Form der Fig. 1.[2]) *V* ist die Versuchsflüssigkeit, in der das Gewebe suspendiert ist. Die Gas-Zu- und Ableitungsrohre (*Z* und *A*) werden durch den Schliff *S* mit dem Gefäß verbunden. Mit einer Spiralfeder (nicht gezeichnet) werden die Schliffflächen zusammengehalten. Ist das Gewebe in das Gefäß hineingegeben, so läßt man durch *Z* das Gasgemisch, mit dem die Flüssigkeit ins Gleichgewicht gesetzt werden soll, einströmen. Bei *A* wird während des Einleitens ein Gummischlauch eingesetzt, der unter Wasser endet. Ist die Luft aus dem Gefäß verdrängt, so stellt man die Gaszufuhr ab und schließt die Hähne. Das ganze Gefäß wird in früher beschriebener Weise[1]) in der Warburg-Apparatur bei Körpertemperatur bewegt. Es taucht etwa bis zum Punkt *P* in den Thermostaten ein.

4. Messung der Sauerstoffatmung. Die Messung der Sauerstoffatmung geschieht manometrisch nach den Vorschriften Warburgs.

5. Bestimmung des Aminostickstoffes. Die Aminostickstoffbestimmung erfolgt manometrisch nach van Slyke[3]) mit salpetriger Säure,

---

[1]) Krebs und Henseleit, a. a. O., S. 59—60.

[2]) Bezogen von der Glasbläserei Kramer, Freiburg i. B., Albertstr.

[3]) J. of biol. Chem. **83**, 425 (1929).

nach Enteiweißung der Versuchslösung mit Trichloressigsäure. Pro Kubikzentimeter Versuchslösung werden 0,2 ccm 10%ige Trichloressigsäure hinzugefügt, nach kurzem Stehenlassen wird zentrifugiert und ein aliquoter Teil der klaren Lösung für die Bestimmung verwendet. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ammoniak entfernen wir zuerst das Ammoniak nach Zusatz von Magnesiumhydroxyd durch Erhitzen der Lösung, wie van Slyke[1]) vorschreibt. Harnstoff wird mit Urease zersetzt und dann wie Ammoniak behandelt.

6. Ammoniakbestimmung. Die Ammoniakbestimmung erfolgt mit der Apparatur, die von Parnas[2]) für die Ammoniakbestimmung im Blut angegeben ist. Da die Ammoniakmengen in unseren Versuchen größer als die im Blut vorkommenden Mengen sind, haben wir die Vorlage des Apparates vergrößert. Wir unterwerfen einen aliquoten Teil der Versuchslösung nach Alkalisierung mit Boratpuffer im Vakuum der Wasserdampfdestillation, bis 20 ccm Wasser übergegangen sind. Kleine Mengen Ammoniak (0,002 mg) messen wir kolorimetrisch mit Neßlers Reagens, größere Mengen (um 0,2 mg) titrimetrisch.

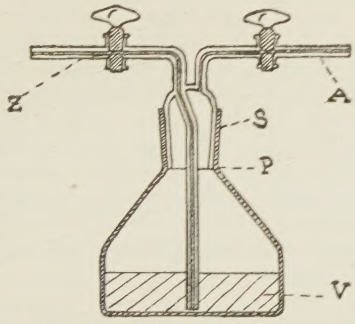


Fig. 1.
Versuchsgefäß für Versuche an größeren Gewebemengen.
1/4 natürlicher Größe.

7. Bestimmung der Ketosäuren.

a) Manometrische Methode. Brenztraubensäure bestimmen wir nach der Carboxylasemethode von Warburg, Kubowitz und Christian in der Anordnung, die von H. Westerkamp in unserem Laboratorium ausgearbeitet und beschrieben ist.[3]) Verdünnt man nach Lebedew[4]) hergestellten Hefesaft aus untergäriger Bierhefe mit Acetatpuffer von p_H 5 auf das 5—10fache, so wird weder Traubenzucker noch Hexosephosphat (Robisonester und Embdenester) mit meßbarer Geschwindigkeit vergoren,

[1]) J. of biol. Chem. **83**, 425 (1929).
[2]) Biochem. Z. **152**, 1 (1924); **155**, 247 (1925); **173**, 224 (1926).
[3]) H. Westerkamp, Inaug. Diss. Freiburg.
[4]) Vgl. A. Harden in Methodik der Fermente von Oppenheimer und Pincussen.

wohl aber Brenztraubensäure. Die Gärungskohlensäure wird manometrisch gemessen.

Die verdünnten Hefeextrakte greifen bei geeigneter Versuchsanordnung keine der bisher untersuchten Zucker oder Phosphorsäureester der Zucker an. Sie sind — soweit sich übersehen läßt — ein spezifisches Reagens auf Ketosäuren. Mit etwa gleicher Geschwindigkeit, mit der Brenztraubensäure vergoren wird, werden in unserer Anordnung die Ketosäuren vergoren, die der α-Aminobuttersäure und dem Valin entsprechen, die Methylbrenztraubensäure (α-Ketobuttersäure) und die Di-methyl-brenztraubensäure (α-Ketoisovaleriansäure). Etwas langsamer vergären in unserer Anordnung die drei untersuchten α-Ketocapronsäuren (α-Keto-n-capronsäure, Methyläthyl-brenztraubensäure, Isopropylbrenztraubensäure). Die angeführten Ketosäuren können daher wie Brenztraubensäure mit der Carboxylasemethode neben Kohlehydraten bestimmt werden. Welche von den 6 Ketosäuren vorliegt, läßt sich mit der Methode nicht entscheiden. Die übrigen Ketosäuren — die aromatischen Ketosäuren und die Keto-dicarbonsäuren — können bisher neben Kohlenhydraten manometrisch nicht gemessen werden, da sie in dem verdünnten Hefeextrakt nicht (oder zu langsam) vergären.

b) Isolierung der Ketosäuren. Zur Isolierung der Ketosäuren benutzen wir das von Neuberg und Kobel[1]) eingeführte 2,4-Di-nitrophenylhydrazin. Mit diesem Reagens lassen sich die Ketosäuren im allgemeinen direkt aus den mit Trichloressigsäure enteiweißten Versuchslösungen schon in großer Reinheit fällen. Wir benutzen zur Fällung eine bei Zimmertemperatur gesättigte Lösung in 2 n-Salzsäure. Die näheren Vorschriften sind bei den einzelnen Ketosäuren angegeben.

Zur Umkrystallisation hat sich allgemein folgendes Verfahren bewährt: Das Di-nitro-phenylhydrazon wird in einer kleinen Menge heißen Alkohols gelöst. Die Lösung wird nach dem Filtrieren mit heißem Wasser versetzt, bis die Krystallisation beginnt.

8. Messung des Aminosäurestoffwechsels.

Die Versuchslösungen, in denen die Gewebeschnitte gehalten sind, werden unmittelbar nach der Herausnahme des Gewebes aus der Lösung eisgekühlt und alsbald analysiert. Schnelles Arbeiten ist erforderlich, weil, wie wir im Abschnitt VIII sehen, unter manchen Bedingungen die Umsetzung der Aminosäuren nach der Herausnahme des Gewebes aus der Lösung weitergeht.

a) Aminostickstoff. Bewegt man überlebende Gewebe in Sauerstoffatmosphäre in physiologischer Salzlösung, so erscheint häufig in der Lösung nach van Slyke bestimmbarer Aminostickstoff.[2]) Die Mengen an Aminostickstoff wechseln mit den Versuchsbedingungen und der Gewebeart; sie betragen bis zu 3 cmm ($= 1{,}9 \cdot 10^{-3}$ mg) pro Milligramm Trockengewicht und Stunde. Nach Enteiweißung mit Trichloressigsäure ist der Aminostickstoffgehalt der Lösung nur unwesentlich vermindert, ein Beweis dafür, daß der Aminostickstoff nicht hochmolekularen Eiweißkörpern angehört. Die chemische Natur dieser abgegebenen Aminoverbindungen haben

[1]) Biochem. Z. **219**, 490 (1930); **232**, 479 (1931); vgl. auch Allen, J. Amer. Chem. Soc. **52**, 1955 (1930).

[2]) Vgl. Winterstein u. Hirschberg, Biochem. Z. **167**, 401 (1925).

wir nicht genauer untersucht; die Abgabe von Aminostickstoff durch Gewebe ist jedoch methodisch wichtig; sie muß bei der Messung des Aminosäureverbrauchs der Gewebe berücksichtigt werden.

Fügt man zur Versuchslösung Aminosäuren hinzu, so sinkt bei Anwesenheit lebender Gewebe der Aminostickstoffgehalt der Lösung gewöhnlich mit der Zeit ab. Dieses Verschwinden von zugefügten Aminosäuren und die erwähnte Abgabe von Aminostickstoff durch Gewebe sind, wie es scheint, voneinander unabhängige Vorgänge.[1]) In Gegenwart von Aminosäuren rührt daher die Änderung des Aminostickstoffgehaltes der Lösung von zwei verschiedenen Reaktionen her, der Bildung von Aminostickstoff (B) und dem Verbrauch an Aminostickstoff (V). Die Konzentrationsänderung an Aminostickstoff in der Lösung, die wir messen, ergibt die Summe beider Größen (S).

$$S = B + V.$$

Um den Verbrauch V zu berechnen, muß B bekannt sein. Wir bestimmen B in einem Parallelversuch ohne Zusatz von Aminosäuren und erhalten den gewünschten Wert V, indem wir B von S subtrahieren. Wir nehmen dabei an, daß B in Gegenwart und in Abwesenheit von Aminosäuren gleich ist.

In vielen Versuchen dieser Arbeit, besonders in denjenigen, die an Nierengeweben angestellt sind, hat B nur die Bedeutung eines Korrektionsfaktors. Selbst wenn daher unsere Berechnungsweise nur angenähert richtig ist, so entsteht dadurch trotzdem im allgemeinen kein wesentlicher Fehler. Bei anderen Geweben, bei denen der Aminostickstoffverbrauch im Vergleich zur Niere klein ist, sind die angegebenen Zahlen für den Aminostickstoffverbrauch weniger sicher; wir werten sie daher nur größenordnungsmäßig.

b) Ammoniakbildung. Die Mehrzahl der tierischen Gewebe scheidet schon ohne Zusatz von Aminosäuren geringe Mengen Ammoniak aus.[2]) Am größten ist diese „spontane" Ammoniakbildung im Nierengewebe. In der Leber von Hungertieren treten etwa äquivalente Mengen Harnstoff auf. Pro Milligramm und Stunde bilden diese Gewebe etwa 0,5—1,5 cmm Ammoniak oder Harnstoff. Zum Teil stammt dieses Ammoniak aus dem in der Atmung verbrannten Eiweiß. Denn unter anaeroben Bedingungen sinkt die Ammoniakbildung ab. Sie wird aber in den meisten Fällen nicht gleich Null; die Mehrzahl der Gewebe scheiden auch unter anaeroben Bedingungen Ammoniak aus. In dieser Arbeit beschäftigen wir uns zunächst nicht eingehender mit der „spontanen" Ammoniakbildung der Gewebe, sondern mit derjenigen Ammoniakabgabe, die nach Zusatz von Aminosäuren auftritt und die unter manchen Versuchsbedingungen das 10—50 fache der „spontanen" Ammoniakbildung beträgt.

---

[1]) Wir schließen das, weil man in vielen Versuchen nur dann, wenn man unter dieser Annahme rechnet, den Aminostickstoffverbrauch so groß findet, wie er auf Grund der gleichzeitig gemessenen Ammoniak- und Ketosäurebildung als Minimalwert zu erwarten ist.

[2]) Vgl. Winterstein u. Hirschberg, a. a. O.; Tashiro, Amer. J. Physiol. **60**, 519 (1922); Loebel, Biochem. Z. **161**, 229 (1925); Meyerhof, Lohmann u. Meier, Biochem. Z. **157**, 459 (1925); Warburg, Stoffw. d. Tumoren, S. 139; Schwarz u. Dibold, Biochem. Z. **251**, 190 (1932).

In den Tabellen und Protokollen gebe ich sowohl die „spontane" Ammoniakbildung als auch die Ammoniakbildung nach Zusatz von Aminosäuren an. Die Differenz beider Größen ist der Minimalwert der Geschwindigkeit, mit der zugefügte Aminosäuren (bilanzmäßig) desaminiert werden.

c) Ketosäurebildung. In Lösungen, denen keine Aminosäuren hinzugefügt sind, geben tierische Gewebe nach den bisherigen Erfahrungen keine meßbaren Ketosäuremengen ab. Eine Ketosäurebildung ist bisher nur für solche Bedingungen bekannt, die in unseren Versuchen nicht vorlagen. A. Hahn[1]), O. Warburg und F. Kubowitz[2]), ferner W. B. Wendel[3]) fanden, daß Muskelgewebe und rote Blutzellen nach Methylenblauzusatz Brenztraubensäure bilden. Die Brenztraubensäure stammt dabei aus der unvollständigen Verbrennung von Kohlenhydraten oder von Milchsäure, Äpfelsäure und Citronensäure.

Die Messung der Ketosäurebildung aus Aminosäuren in tierischen Geweben ist am einfachsten, wenn es sich um die aliphatischen α-Ketosäuren handelt. Nach Schluß des Versuchs wird in einem aliquoten Teil der mit Acetatpuffer angesäuerten Versuchslösung die Ketosäure direkt mit Carboxylase bestimmt. Im übrigen muß man zum Nachweis der Ketosäuren bisher mit größeren Gewebemengen arbeiten. Etwa 100–200 mg Nierengewebe (Trockengewicht) werden mit 50 ccm Versuchslösung in Gefäßen nach Fig. 1 einige Stunden bei 37,5° in Sauerstoffatmosphäre bewegt. Nach Ablauf der Versuchszeit wird die Lösung mit $^1/_{10}$ Vol. 30%iger Trichloressigsäure enteiweißt. Im eiweißfreien Filtrat wird die Ketosäure mit 2,4-Dinitro-phenylhydrazin gefällt. Über die weiteren Einzelheiten vgl. Abschnitt VIII, 3.

d) Versuchszeit. Im allgemeinen empfiehlt es sich, die Versuchszeit nicht über 2 Stunden auszudehnen, da nach längeren Zeiten der Stoffwechsel allmählich absinkt. Ich habe gewöhnlich mit Versuchszeiten von 1 oder 2 Stunden gearbeitet.

9. Fehlergrößen.

Von den vier chemischen Reaktionen, deren Geschwindigkeit in überlebenden Geweben wir gemessen haben, lassen sich 3 Größen, Sauerstoffatmung, Ammoniakbildung und Ketosäurebildung im allgemeinen mit einer Genauigkeit von etwa 5% bestimmen. Nur da, wo die Umsätze klein sind und die Stoffwechselquotienten (vgl. folgenden Abschnitt) unter dem Wert 1 liegen, sind in manchen Versuchen der kleineren Ausschläge wegen die Fehler größer. Sie mögen in diesen Fällen bis zu 20% betragen. Die vierte Stoffwechselgröße, der Verbrauch an Aminostickstoff, ist aus zwei Gründen weniger genau zu messen. Erstens ist die Bestimmung — im Gegensatz zu den übrigen — eine Differenzbestimmung und zweitens liegt in der Berechnung, wie oben erörtert, ein Unsicherheitsfaktor. Doch übersteigt die Fehlerbreite in den Versuchen mit Nierengewebe, an dem die Mehrzahl der Versuche dieser Arbeit ausgeführt sind, auch hier 5 bis 10% nicht.

---

[1]) Z. Biol. **88**, 587 (1929); **89**, 332 (1929); Amer. J. Physiol. **90**, 373 (1929).
[2]) Biochem. Z. **221**, 494 (1930); **227**, 254 (1930).
[3]) Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **27**, 624 (1930).

10. Maßeinheiten.

Die umgesetzten Stoffmengen drücken wir wie in früheren Arbeiten in Kubikmillimeter Gas aus (0°, 760 mm Quecksilber). Wir setzen 1 Milligrammatom Aminostickstoff (14 mg) 22400 cmm äquivalent und bilden als Maß für den Umsatz an Aminostickstoff den Quotienten:

$$Q_{\text{Amino-N}} = \frac{\text{Kubikmillimeter umgesetzter Aminostickstoff}}{\text{Milligramm Gewebe} \times \text{Stunden}}.$$

Entsprechend bilden wir als Maß für die Ammoniakbildung den Quotienten:

$$Q_{NH_3} = \frac{\text{Kubikmillimeter gebildetes Ammoniak}}{\text{Milligramm Gewebe} \times \text{Stunden}},$$

indem wir 1 Millimol Ammoniak (17 mg) 22400 cmm äquivalent setzen.

Als Maß für die Ketosäurebildung gebrauchen wir den Quotienten:

$$Q_{\text{Ketosäure}} = \frac{\text{Kubikmillimeter carboxylatisch abgespaltene } CO_2}{\text{Milligramm Gewebe (trocken)} \times \text{Stunden}}.$$

Das Verschwinden einer Substanz wird durch negatives, das Entstehen durch positives Vorzeichen ausgedrückt.

II. Ort der Desaminierung der Aminosäuren im Tierkörper.

Prüft man die Geschwindigkeit, mit der überlebende Gewebe zugefügte Aminosäuren beseitigen und Ammoniak aus ihnen abspalten, so findet man von Organ zu Organ und von Aminosäure zu Aminosäure verschiedene Werte, wie Tabellen 1, 2 und 3 zeigen.

Tab. 1 zeigt, wie schnell d,l-Alanin in den verschiedenen Organen der Ratte verschwindet und Ammoniak entwickelt. Man sieht, daß die Mehrzahl der untersuchten Gewebe Alanin verbrauchen. Das überraschende Ergebnis ist aber, daß die größte Umsatzgeschwindigkeit nicht in der Leber — was man bisher glaubte —, sondern in der Niere erreicht wird. Im Mittel wird d,l-Alanin in der Niere unter den gegebenen Versuchsbedingungen 5 mal schneller als in der Leber angegriffen.

Tab. 2 zeigt, daß nicht nur d,l-Alanin, sondern fast alle untersuchten Aminosäuren in der Niere schneller als in der Leber umgesetzt und desaminiert werden. Bei einigen Aminosäuren — Ornithin, Lysin, Asparaginsäure — ist Umsatz und Desaminierungsgeschwindigkeit in der Niere in den angeführten Beispielen sogar 10—20 mal größer als in der Leber.

Tab. 3 zeigt, daß, wie bei der Ratte, auch bei Hund und Katze die Umsetzung und Desaminierung der Aminosäuren mit großer Geschwindigkeit in der Niere erfolgt und daß die Umsatzgeschwindigkeit in der menschlichen Niere von der gleichen Größenordnung wie in den untersuchten tierischen Nieren ist.

Tabelle 1.

Verbrauch von d,l-Alanin, Bildung von Ammoniak und Verbrauch von Sauerstoff in Rattengewebe.

(m/100-d,l-Alanin in phosphatgepufferter Salzlösung, 37,5°.)

Gewebe	$Q_{\text{Amino-N}}$			Q_{NH_3}		Q_{O_2}	
	ohne Alanin	mit Alanin	Differenz	ohne Alanin	mit Alanin	ohne Alanin	mit Alanin
1. Niere	+3,05	− 9,80	−12,8	+2,67	+12,6	−18,7	−43,2
	+4,86	− 7,81	−12,6		+ 4,87	−17,7	−33,6
	+2,05	− 9,41	−11,5	+0,86	+ 5,22	−20,6	−27,5
	+1,53	− 9,10	−10,6	+0,74	+ 5,90	−19,6	−31,9
	0	−22,9	−22,9	+1,23	+ 5,93	−17,4	−28,7
	0	− 6,31	− 6,31	0	+ 5,00	−13,3	−27,4
2. Leber[1])	+2,88	+ 1,57	− 1,31	+0,38	+ 1,31	−11,4	−13,8
	+4,38	− 0,78	− 5,16	+0,54	+ 1,36	− 9,25	−10,48
	+2,06	0	− 2,06	+1,07	+ 2,34	−11,1	−13,1
3. Zwerchfell	+2,79	0	− 2,79	+0,57	+ 0,37	− 3,82	− 3,26
	+2,65	− 0,24	− 2,89	+0,17	+ 0,19	− 4,49	− 3,81
	0	− 2,16	− 2,16	0	+ 0,24	− 8,35	− 7,34
4. Milz	+1,79	+ 0,58	− 1,21	+0,42	+ 0,32	− 5,17	− 5,30
	+1,78	+ 0,96	− 0,82	+0,45	+ 0,32	− 5,91	− 5,18
5. Placenta	+2,23	− 2,75	− 4,98	+0,64	+ 0,34	− 3,82	− 4,89
	+2,90	− 1,55	− 4,45	+0,93	+ 0,70	− 4,37	− 3,92
6. Hoden	+0,80	+ 0,80	0	+0,12	+ 0,14	− 9,18	− 9,24
7. Darmwand	—	—	—	+0,76	+ 0,67	− 6,32	− 6,32
	+3,05	+ 0,79	− 2,26	+0,61	+ 0,75	− 8,43	− 7,88
	—	—	—	+1,73	+ 2,08	− 9,9	−11,2
8. Pankreas	+1,80	0	− 1,80	+0,39	+ 0,28	− 4,78	− 5,42
9. Gehirn	+1,55	− 1,57	− 3,02	+0,64	+ 0,73	−13,0	−11,5
	0	—	—	+1,20	+ 0,77	−12,9	−11,6
10. Rattencarcinom	+1,71	− 1,60	− 3,31	+0,15	+ 0,26	− 4,28	− 5,09
11. Schilddrüse (Hund)	+0,55	− 0,76	− 1,3	+1,72	+ 1,0	− 6,6	− 6,4
12. Sarkom (Mensch)	+2,85	0	− 2,85	+0,66	+ 0,47	− 4,2	− 4,7
13. Netzhaut (Rind)	—	—	—	+1,41	+ 2,68	− 8,7	− 8,8
	—	—	—	+0,72	+ 0,89	− 8,2	−11,8
	0	− 1,90	− 1,90	+1,05	+ 1,29	− 8,1	−11,3

[1]) Vgl. Fußnote folgende Seite.

Tabelle 2.

Vergleich des Stoffwechsels der Aminosäuren in Leber und Niere der Ratte. (Konzentration der Aminosäuren m/100.)

Nummer	Aminosäure	Stoffwechsel der Niere							Stoffwechsel der Leber						
		$Q_{\text{Amino-N}}$			Q_{NH_3}		Q_{O_2}		$Q_{\text{Amino-N}}$			Q_{NH_3} [1])		Q_{O_2}	
		ohne Aminosäure	mit Aminosäure	Differenz	ohne Aminosäure	mit Aminosäure	ohne Aminosäure	mit Aminosäure	ohne Aminosäure	mit Aminosäure	Differenz	ohne Aminosäure	mit Aminosäure	ohne Aminosäure	mit Aminosäure
1	Glykokoll	+1,62	− 3,38	− 5,0	+1,87	+ 3,60	−21,1	−21,4	+3,2	+1,0	−2,2	+0,30	+0,27	−13,0	−11,1
2	d,l-Alanin	+2,04	−12,0	−14,0	+1,47	+ 7,90	−23,5	−41,0	+2,6	+0,88	−1,7	+1,13	+2,85	−12,4	−15,2
3	d,l-Valin	+1,62	− 8,70	−10,3	+1,87	+ 7,4	−21,1	−25,0	+3,20	+1,02	−2,28	+0,30	+0,18	−13,0	−12,1
4	d,l-α-Aminobuttersäure	+0,86	−19,8	−20,7	+1,65	+15,3	−18,5	−19,2	+0,36	−6,28	−6,6	+3,58	+4,02	−10,4	−11,4
5	d,l-Leucin	+2,04	− 3,32	− 5,36	+1,47	+ 4,57	−23,5	−29,1	+2,6	+1,78	−0,8	+1,13	+1,39	−12,4	−14,2
6	d-Isoleucin	+2,04	+ 0,60	− 1,44	+1,47	+ 2,32	−23,5	−21,7	+2,6	+1,8	−0,8	+1,13	+1,11	−12,4	−11,1
7	d,l-Norleucin	0	−17,2	−17,2	+1,23	+12,5	−17,4	−23,2	+2,88	−5,42	−8,3	—	—	−13,0	−11,8
8	d,l-Asparaginsäure	+2,04	− 8,75	−10,8	+1,47	+ 5,96	−23,5	−37,0	+2,6	+3,0	0	+1,13	+0,88	−12,4	−12,2
9	d-Glutaminsäure	+1,62	−10,0	−11,6	+1,87	+ 7,86	−23,5	−43,2	+3,2	+1,02	−2,2	+0,30	+0,11	−13,0	−12,5
10	d-Ornithin	+1,62	−23,0	−24,6	+0,91	+15,4	−17,4	−38,2	+3,2	+1,14	−2,0	+0,30	+1,25	−13,0	−14,7
11	d-Lysin	+1,62	−22,5	−24,1	+1,87	+ 5,11	−21,1	−25,4	+3,2	+2,1	−1,1	+0,30	+1,03	−13,1	−14,5
12	d,l-Serin	+1,65	− 9,31	−11,0	+1,32	+ 4,44	−18,9	−16,9	+0,36	−0,34	−0,70	+3,58	+3,51	—	—
13	l-Cystin	—	—	—	+1,32	+ 1,55	—	—	—	—	—	+3,58	+3,16	−10,4	−12,5
14	d,l-Phenylalanin	+1,62	−11,15	−12,8	+1,87	+11,9	−21,1	−23,3	+3,2	0	−3,2	+0,30	+0,86	−13,0	−12,5
15	l-Tyrosin	—	—	—	+1,32	+ 3,14	−18,7	−24,4	—	—	—	+3,58	+3,03	−10,4	−11,2
16	l-Histidin	+1,65	− 0,74	− 2,4	+1,32	+ 2,23	−18,9	−21,0	+2,5	+1,25	−1,3	+1,06	+1,48	−10,8	−11,3
17	l-Tryptophan	+1,65	+ 0,77	− 0,9	+1,32	+ 2,20	−18,9	−13,5	+2,5	+0,61	−1,9	+1,06	+1,06	−10,8	−10,4
18	d,l-Prolin	—	—	—	+1,65	+ 3,72	−18,5	−37,8	—	—	—	+3,58	+2,0	−10,4	−13,0
19	l-Oxyprolin	—	—	—	+1,65	+ 3,20	−18,5	−19,8	—	—	—	+3,58	+2,3	−10,4	−10,7

[1]) Bei der Leber ist der gebildete Harnstoff in Äquivalente Ammoniak umgerechnet.

Tabelle 3.

Stoffwechsel der Aminosäuren in Leber und Niere bei Hund, Katze und Mensch.

Aminosäure	Hund				Katze				Mensch	
	Leber		Niere		Leber		Niere		Niere	
	$Q_{\text{Amino-N}}$	Q_{NH_3}	$Q_{\text{Amino-N}}$	Q_{NH_3}	$Q_{\text{Amino-N}}$	Q_{NH_3}	$Q_{\text{Amino-N}}$	Q_{NH_3}	$Q_{\text{Amino-N}}$	Q_{NH_3}
d,l-Alanin . .	−3,17	+1,70	−3,82	+0,78	−2,79	+2,98	−10,5	+12,3	−11,85	+5,08
d,l-Asparaginsäure	—	—	—	—	—	—	—	—	−14,2 (Rinde)	+5,75
	—	—	—	—	—	—	—	—	−12,6 (Mark)	+5,45
d-Glutaminsäure	−0,71	+0,10	−3,89	+2,08	−0,28	+0,45	−5,82	+4,12	− 7,3 (Rinde)	+2,8
d,l-Phenylalanin	−0,55	+0,40	−6,91	+3,18	0	+2,14	−6,38	+7,69	—	—

Häufig ist die Zunahme an Ammoniak kleiner als die Abnahme an Aminostickstoff. Dies bedeutet, daß ein Teil der umgesetzten Aminosäuren (in der Bilanz) nicht desaminiert, sondern in andere Stoffe umgewandelt wird, in denen der Stickstoff nicht mehr als Aminostickstoff vorliegt.

III. Einfluß der Aminosäurekonzentration auf die Desaminierungsgeschwindigkeit.

Die in den Tab. 1—3 angegebenen Zahlen für die Ammoniakbildung aus Aminosäuren in der Niere sind noch nicht maximale Werte. Bei vielen Aminosäuren steigt mit zunehmender Konzentration an Aminosäure die Desaminierungsgeschwindigkeit stark an, wie folgendes Beispiel zeigt:

Tabelle 4.

Desaminierung von l-Valin bei verschiedener l-Valinkonzentration in Rattenniere. Versuchslösung bicarbonathaltige Salzlösung (c_{NaHCO_3} = m/20. Gas 5 % CO_2 in O_2, 37,5°. Versuchszeit 1 Stunde.

l-Valinkonzentration [Mole/Liter]	mg Niere	Gebildetes NH_3 [cmm]	Q_{NH_3}
$8{,}5 \cdot 10^{-2}$	2,11	105	49,8
$4{,}25 \cdot 10^{-2}$	1,86	100	53,8
$2{,}13 \cdot 10^{-2}$	1,71	75	43,8
$1{,}06 \cdot 10^{-2}$	1,87	46,4	24,7
$0{,}53 \cdot 10^{-2}$	2,10	41,5	19,8
$0{,}27 \cdot 10^{-2}$	2,05	21,8	10,6

Man sieht aus der Tabelle, daß erst etwa bei der Aminosäurekonzentration m/20 die Geschwindigkeit der Ammoniakabspaltung ihr Maximum erreicht. Ich habe jedoch in dieser Arbeit den Stoffwechsel der Aminosäuren nicht immer unter Bedingungen untersucht, unter denen die Umsätze maximal sind, und zwar aus zwei Gründen: einerseits, um im Bereich der im Leben vorkommenden Aminosäurekonzentrationen zu bleiben, und ferner, weil sich die Abnahme des Aminostickstoffs in der Lösung nur bei geringeren Aminosäurekonzentrationen genauer messen läßt; bei hoher Aminokonzentration sind die prozentischen Änderungen der Konzentration häufig zu klein, um genauer meßbar zu sein.

IV. Desaminierung optisch aktiver Aminosäuren.

Einen unerwarteten Unterschied finden wir in dem Verhalten von stereoisomeren optischen Antipoden der Aminosäuren. Die optisch nicht natürlichen Formen der meisten Aminosäuren werden viel schneller (bis zu 25 mal schneller) in der Niere vieler Tiere desaminiert als die optisch natürlichen Formen. In der folgenden Tabelle sind die Versuche mit optisch aktiven Aminosäuren an Rattenniere zusammengestellt. Die Konzentration an Aminosäure war hoch (m/20), so daß die Werte für die Ammoniakabspaltung den maximalen Werten entsprechen.

Wie die Tab. 5 zeigt, werden die untersuchten nicht natürlichen α-Aminosäuren — mit Ausnahme der Asparaginsäure — etwa im Mittel 10 mal schneller desaminiert als die natürlichen Verbindungen. Ähnlich der Rattenniere verhalten sich die Nieren anderer Säugetiere, die ich bisher untersucht habe (Schwein, Katze, Hund, Kaninchen). Eine Ausnahme bildet die menschliche Niere, die die optischen Antipoden etwa gleich schnell desaminiert (Tab. 22). Der Tierkörper kann im Gegensatz zur Hefe, die nach F. Ehrlich die nicht natürlichen Formen gar nicht oder nur sehr langsam angreift, auch körperfremde Aminosäuren verwerten. Durch die Desaminierung bildet er aus den stereochemisch körperfremden Stoffen körpereigene Stoffe, da die Ketosäuren, die den verschiedenen optischen Antipoden entsprechen, als inaktive Stoffe identisch sind.

Daß der Tierkörper überhaupt imstande ist, nichtnatürliche Aminosäuren umzusetzen, ist schon länger bekannt. So fand beispielsweise Embden[1]), daß Leber aus d-Leucin Aceton bildet, und Konishi[2]), daß

[1]) Hofmeisters Beitr. **11**, 348 (1908).
[2]) Diese Z. **143**, 188 (1925).

d-Histidin im Körper zerstört wird, Friedmann[1]), daß Racemate der α-Aminosäuren im Körper vollständig umgesetzt werden.[2])

Tabelle 5.

Desaminierung optisch aktiver Aminosäuren in Rattenniere.

Versuchslösung: bicarbonathaltige Salzlösung (c_{NaHCO_3} = m/20).

Aminosäurekonzentration m/20. Gas 5% CO_2 in O_2, 37,5°. Die Ammoniakbildung ohne Aminosäurezusatz betrug 1,33 cmm pro mg und Stunde. Die natürlichen Aminosäuren sind mit einem Stern versehen.

Aminosäure	mg Niere	Gebildetes Ammoniak in cmm (in 60 Min.)	Q_{NH_3}
*d-Alanin	3,82	12,8	3,36
l-Alanin	1,48	56	37,8
*d-Valin	4,20	16,2	3,86
l-Valin	1,84	106	57,6
d-Leucin	1,92	67	34,9
*l-Leucin	2,89	19,3	6,68
d-Phenylalanin . . .	1,04	80	77,0
*l-Phenylalanin . . .	3,63	37,8	10,4
d-Histidin	2,91	28,4	9,75
*l-Histidin	4,86	15,5	3,18
d-Asparaginsäure . .	5,26	13,65	2,59
*l-Asparaginsäure . .	3,86	35,8	9,28

V. Chemische Konstitution und Desaminierungsgeschwindigkeit.

Unter denselben Bedingungen, unter denen die in der Tab. 5 angegebenen Zahlen gewonnen sind, habe ich die maximale Ammoniakbildung aus einer Reihe weiterer Aminosäuren untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tab. 6 zusammengefaßt. Aus den beiden Tab. 5 und 6 (alle Versuche sind an der gleichen Rattenniere angestellt) ergeben sich folgende Beziehungen zwischen chemischer Konstitution der Aminosäuren und Desaminierungsgeschwindigkeit:

1. Die größten Geschwindigkeiten zeigen — wie schon im vorigen Abschnitt ausgeführt — die stereochemisch nicht natürlichen einfachen α-Aminosäuren sowie die entsprechenden Racemate. Aus dem Verhalten der optisch aktiven Verbindungen ist zu entnehmen, daß von den Racematen vorwiegend der nicht natürliche Anteil Ammoniak liefert.

---

[1]) Hofmeisters Beitr. **11**, 177 (1908).

[2]) Vgl. auch V. du Vigneaud u. Mitarb., J. of biol. Chem. **98**, 565 (1932). (Verwertung von d-Tryptophan).

Tabelle 6.

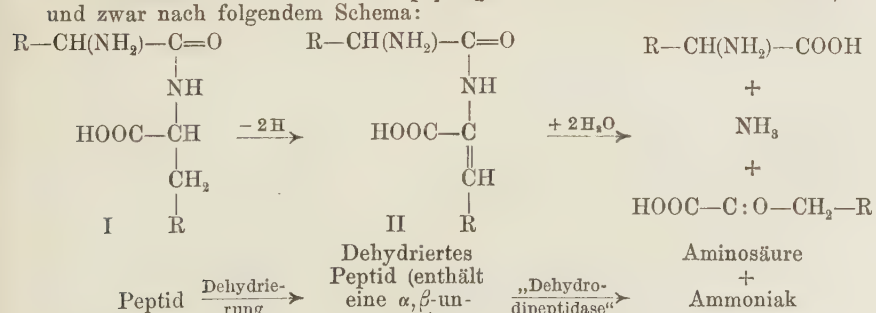
Maximale Desaminierungsgeschwindigkeit verschiedener Aminosäuren in Rattenniere. Versuchsbedingungen wie Tabelle 5. (Tyrosin und Phenylaminoessigsäure wurden in gesättigter Lösung verwandt.)

Aminosäure	mg Niere	Gebildetes Ammoniak in cmm (in 60 Min.)	Q_{NH_3}
d,l-Norleucin	3,09	188	60,7
d,l,α-Aminobuttersäure . .	2,33	40,2	17,2
d,l-Alanin	1,93	49,8	25,8
d,l-Serin	3,14	37,0	11,8
d-Glutaminsäure	4,51	40,9	9,06
d,l-Glutaminsäure	4,28	22,6	5,30
d,l-Asparaginsäure	2,72	41,5	15,2
d-Ornithin	3,11	18,65	6,00
d-Lysin	4,92	21,8	4,42
l-Tyrosin	3,16	13,7	4,34
d,l-Phenylaminoessigsäure .	4,50	19,0	4,23
Glykokoll	3,62	15,7	4,34
d-Isoleucin	5,65	18,3	3,24
l-Oxyprolin	2,75	15,2	5,52
l-Prolin	4,19	27,9	6,68
d,l-Prolin	5,15	23,0	4,48
l-Tryptophan	5,42	24,2	4,46

2. Von den natürlichen Aminosäuren zeigen die α-Aminodicarbonsäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure) die größten Desaminierungsgeschwindigkeiten. Es folgen die Diaminosäuren (Ornithin, Lysin) und die natürlichen einfachen α-Aminosäuren.

VI. Desaminierung von Peptiden.

Ausgehend von der Erfahrung, daß manche Aminosäuren in Peptidbindung reaktionsfähiger als in freiem Zustande sind, hat M. Bergmann[1]) die Frage aufgeworfen, ob in manchen Fällen die oxydative Desaminierung der Aminosäuren schon an den peptidgebundenen Aminosäuren einsetzt, und zwar nach folgendem Schema:



[1]) Diese Z. **205**, 65 (1932); Klin. Wschr. **11** (1932), dort weitere Literatur.

Das Wesentliche der Bergmannschen Hypothese ist, daß zunächst durch Dehydrierung ein Peptid entstünde, das eine α,β-ungesättigte[1]) Aminosäure enthält, und daß sekundär durch fermentative Hydrolyse der peptidgebundene — nicht der freie — Aminostickstoff als Ammoniak abgespalten wird.

Zur Prüfung seiner Hypothese synthetisierte Bergmann dehydrierte Peptide vom Typus der Formel II und untersuchte, ob derartige dehydrierte Peptide von den Fermenten des Tierkörpers angegriffen werden. In der Tat fand er im Pankreatin und besonders auch in der Niere ein Ferment, das dehydrierte Dipeptide in Ketosäure, Ammoniak und Aminosäure hydrolytisch zerlegt. Die Existenz einer „Dehydro-dipeptidase" macht es wahrscheinlich, daß dehydrierte Peptide im Tierkörper vorkommen, andernfalls wäre nicht verständlich, daß der Körper ein Ferment besitzt, das nach Bergmann spezifisch auf dehydrierte Peptide eingestellt ist.

Angeregt durch die Versuche von Bergmann, habe ich am Nierengewebe der Ratte die Geschwindigkeit der Desaminierung einiger Peptide mit der Desaminierung von Aminosäuren verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 zusammengestellt.

Tabelle 7.

Vergleich der Desaminierungsgeschwindigkeit von Aminosäuren und Peptiden in Schnitten von Rattenniere. Konzentration der Aminosäuren und Peptide m/20. Versuchszeit 1 Stunde.

Zugefügte Substanz	mg Gewebe	Gebildetes NH_3 (cmm)	Q_{NH_3}
Glykokoll	4,44	12,6	2,83
Glycyl-glycin	4,13	12,3	2,97
Ohne	3,11	4,21	1,36
Glykokoll	3,55	10,8	3,05
l-Leucin	2,58	17,2	6,66
l-Leucyl-glycin	3,20	13,95	4,36
Glycyl-l-leucin	3,88	15,9	4,10
Ohne	3,11	4,21	1,36
Glykokoll	3,55	10,8	3,05
d-Leucin	1,99	49,5	24,9
d-Leucyl-glycin	3,91	10,9	2,79
Ohne	3,11	4,21	1,36
Glykokoll	3,55	10,8	3,05
d-Alanin	4,55	19,55	4,30
l-Alanin	1,75	51,6	29,5
d,l-Alanyl-glycin . . .	2,78	22,2	8,0

Bei der Beurteilung der Versuche sind zwei Umstände zu berücksichtigen. Erstens kommt die Bergmannsche Hypothese — worauf mich Herr Professor Knoop aufmerksam gemacht hat — nicht für solche Pep-

[1]) Vgl. hierzu Dakin, J. of biol. Chem. **67**, 341 (1926).

tide in Frage, deren Peptidstickstoff einem Glykokollrest angehört, da in diesem Falle die Bildung eines Peptides mit einer α-β-ungesättigten Aminosäure nicht möglich ist. Zweitens werden viele Peptide unter meinen Versuchsbedingungen (wie die Bestimmung des Aminostickstoffgehaltes der Lösung ergibt) etwa 100 mal schneller durch Dipeptidase gespalten, als die Spaltprodukte desaminiert werden. 1 Gewichtsteil Rattenniere (trocken) kann pro Stunde beispielsweise mehr als 25 Gewichtsteile d-Alanyl-glycin spalten. Infolgedessen ist nach kurzer Versuchszeit schon ein großer Teil der fermentativ spaltbaren Peptide zerfallen. Es ist daher nicht verwunderlich, daß man nach Peptidzusatz häufig dieselbe Ammoniakabspaltung findet wie nach Zusatz der Spaltprodukte.

Unter den von mir untersuchten Peptiden kommt der Bergmannsche Abbauweg für das Glycyl-leucin in Frage. Der Versuch würde eine Desaminierung in der Peptidstufe beweisen, wenn die Ammoniakabspaltung aus dem Peptid größer als aus den Spaltprodukten wäre, was aber nicht der Fall ist. Die erörterte Frage bleibt daher noch offen. Zur Entscheidung wären Versuche mit geeigneten nicht spaltbaren Peptiden nötig.

VII. Harnstoffbildung aus Aminosäuren.

Analysiert man die Versuchsflüssigkeiten, in denen überlebende Gewebe mit Aminosäuren zusammengebracht sind, auf Harnstoff, so findet man, daß aus Arginin die Mehrzahl der Gewebe Harnstoff bildet, was seit den Untersuchungen Kossels[1]) und seiner Schüler (Edlbacher[2]), Clementi)[3]) bekannt ist. Mit der Harnstoffbildung aus Arginin beschäftigen wir uns im folgenden nicht.

Aus allen übrigen Aminosäuren kann allein die Leber Harnstoff bilden. Wir haben die Geschwindigkeit der Harnstoffbildung aus Aminosäuren in der Leber gemessen und mit der Geschwindigkeit der Harnstoffbildung aus Ammoniak verglichen. Die Messung der Harnstoffbildung erfolgte nach der früher angegebenen Methodik.[4])

Wie die Tab. 8 zeigt, wechselt die Geschwindigkeit der Harnstoffbildung von Aminosäure zu Aminosäure; niemals ist sie größer als die Geschwindigkeit der Harnstoffbildung aus Ammoniak. Dieses Ergebnis steht mit der Vorstellung in Einklang, daß die Primärreaktion bei der Harnstoffbildung aus Aminosäuren die Abspaltung von Ammoniak ist, und daß ein direkter Übergang von Aminostickstoff in Harnstoffstickstoff — wie ihn

[1]) Kossel u. Dakin, Diese Z. **41**, 321 (1904); **42**, 181 (1904).

[2]) Diese Z. **148**, 273 (1925); **185**, 1 (1929).

[3]) Zit. nach Hunter u. Dauphinée, Proc. roy. Soc. Lond. Ser. B. **97**, 227 (1924).

[4]) Krebs u. Henseleit, Klin. Wschr. **11**, 757 u. 1137 (1932); Diese Z. **210**, 33 (1932).

Tabelle 8.

Harnstoffbildung aus Aminosäuren in Rattenleber.

Bicarbonathaltige (m/40) physiologische Salzlösung, 37,5°, 2 Stunden. Aminosäurekonzentration m/50. 5 % CO_2 in O_2. (24 Stunden Hunger).

	Zugefügte Aminosäure	mg Leber	$X_{\text{Harnstoff}}$ *) in Gegenwart von Aminosäure	$Q_{\text{Harnstoff}}$ **) in Gegenwart von Aminosäure	$Q_{\text{Harnstoff}}$ ohne Zusatz	$Q_{\text{Harnstoff}}$ mit gleicher Leber in Gegenwart v. m 10^{-2} NH_3 und $2 \cdot 10^{-2}$ m-Lactat
1	Glykokoll	14,49	20,6	0,71	0,24	3,20
2	d-Alanin	14,15	31,7	1,12	0,24	3,20
3	d,l-Alanin	16,11	41,4	1,29	0,24	3,20
4	d,l-Valin	17,91	20,0	0,56	0,24	3,20
5	d,l-Leucin	13,42	30,0	1,12	0,24	3,20
6	l-Leucin	18,11	11,2	0,31	0,24	3,20
7	d-Isoleucin . . .	15,17	7,4	0,24	0,24	3,20
8	d,l-Norleucin . .	15,19	38,6	1,27	0,24	3,20
9	d,l-Asparaginsäure	17,63	11,7	0,33	0,24	3,20
10	l-Asparaginsäure .	18,22	9,3	0,26	0,24	3,20
11	d-Glutaminsäure .	15,63	8,0	0,26	0,24	3,20
12	d-Lysin	9,82	6,6	0,34	1,24	4,36
13	d-Ornithin	6,76	7,9	0,59	0,20	5,52
14	l-Cystin	7,61	19,7	1,29	1,24	4,36
15	d,l-Phenylalanin .	15,23	26,2	0,86	1,24	4,36
16	l-Tyrosin	7,32	8,6	0,58	0,20	5,57
17	Dijodtyrosin . . .	14,48	11,2	0,39	1,24	4,36
18	d,l-Thyroxin . . .	7,31	14,4	0,98	1,24	4,36
19	l-Tryptophan . . .	8,27	21,3	1,29	1,24	4,36
20	l-Histidin	8,16	8,7	0,53	0,20	5,52
21	d,l-Prolin	15,59	15,4	0,49	0,24	3,20
22	l-Prolin	14,0	16,7	0,60	0,24	3,20
23	l-Oxyprolin . . .	6,45	5,3	0,41	0,20	5,52
24	d,l-Serin	8,73	23,8	1,36	1,24	4,36
25	Sarkosin	6,80	20,0	1,48	1,24	4,36
26	Asparagin	9,68	20,9	1,08	0,24	2,20
27	Taurin	7,03	21,6	1,53	1,24	4,36

*) $X_{\text{Harnstoff}}$ = gefundene Harnstoffmenge in cmm CO_2.

**) $Q_{\text{Harnstoff}}$ = gebildeter Harnstoff (in cmm) pro mg Gewebe und Stunde.

Hofmeister[1]) vermutet hatte — nicht vorkommt. Auch aus dem Säureamid Asparagin entsteht Harnstoff nicht schneller als aus Ammoniak.

Neben Harnstoff bildet die Leber unter den gegebenen Versuchsbedingungen aus Aminosäuren Ammoniak nur in unwesentlichen Mengen. Von der Summe des Harnstoffstickstoffs und

[1]) Arch. f. exper. Path. **37**, 426 (1896); Eppinger, Hofmeisters Beitr. **6**, 481 (1905).

Ammoniakstickstoffs entfallen etwa 90—95% auf den Harnstoffstickstoff. Die Geschwindigkeit der Harnstoffbildung aus den verschiedenen Aminosäuren in der Leber ist daher ein Maßstab für die Geschwindigkeit, mit der die verschiedenen Aminosäuren in der Leber (bilanzmäßig) desaminiert werden. —

Fügt man zu Lebergewebe gleichzeitig Ammoniak und Aminosäuren hinzu, so findet man, wie früher schon ausführlich mitgeteilt, nach Zusatz von Ornithin eine gewaltige Beschleunigung der Harnstoffsynthese aus Ammoniak.

Tabelle 9.

Steigerung der Harnstoffbildung aus Ammoniak durch Alanin und Asparagin. Versuchszeit: 2 Stunden. Ammoniakkonzentration 12 mg-%. Volumen der Versuchslösung 3 ccm.

Zugefügte Substanz	mg Leber	$X_{\text{Harnstoff}}$	$Q_{\text{Harnstoff}}$
—	14,37	43,2	1,50
d,l-Alanin (3 mg)	14,90	82,0	2,76
Asparagin (3 mg)	14,42	81,5	2,82
d,l-Lactat (6 mg)	28,02	150	2,68
Pyruvinat (3 mg)	17,77	112	3,14

Tabelle 10.

Harnstoffbildung aus Ammoniak (10^{-2} m) in Gegenwart von Lactat ($2 \cdot 10^{-2}$ m) und von Aminosäuren ($1{,}12 \cdot 10^{-2}$ m).

$Q_{\text{Harnstoff}}$ ohne Aminosäure	Zugefügte Aminosäure	mg Leber	$X_{\text{Harnstoff}}$ (2 Stdn.)	$Q_{\text{Harnstoff}}$
4,87	Glykokoll	7,05	43,5	3,09
4,87	d,l-Alanin	8,91	62,5	3,51
3,50	d,l-Valin	8,73	38,8	2,22
3,50	d,l-Leucin	7,87	28,2	1,79
4,87	d-Ornithin	6,14	**147**	**11,95**
4,84	d-Lysin	10,43	98,5	4,73
3,50	d,l-Asparaginsäure	8,88	43,5	2,45
3,50	d-Glutaminsäure	6,85	51,0	3,72
4,87	d,l-Serin	9,88	84	4,26
3,50	l-Asparagin	6,75	25,5	1,89
3,50	l-Tryptophan	12,03	67,4	2,80
3,50	l-Histidin	10,97	51	2,32
4,87	d,l-Prolin	7,42	56	3,76
3,50	l Oxyprolin	8,32	57	3,42

Mit manchen anderen Aminosäuren (Alanin, Asparagin) erhält man häufig gleichfalls Steigerungen der Harnstoffbildung aus Ammoniak, wie die Tab. 9 zeigt. Diese Steigerungen sind aber anderer Art, wie die Steigerungen durch Ornithin. Sie sind ver-

hältnismäßig gering und vor allem in gleicher Weise mit stickstofffreien Substanzen, beispielsweise mit Milchsäure oder Brenztraubensäure zu erreichen. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist die steigernde Wirkung mancher Aminosäuren gleicher Art wie die noch nicht näher geklärte Wirkung der Milchsäure und Brenztraubensäure. Jedenfalls wirken diese Aminosäuren niemals, wenn die Lösung schon Lactat oder Pyruvinat enthält. In Gegenwart dieser Stoffe ist Ornithin die einzige Aminosäure, die die Harnstoffsynthese aus Ammoniak beschleunigt. Als Beleg dieser für die Theorie der Harnstoffbildung wichtigen Tatsache gebe ich die Tab. 10 wieder.

VIII. Bildung von Ketosäuren aus Aminosäuren.

Otto Neubauer[1]) fand im Jahre 1909, daß nach Verfütterung von körperfremden phenylsubstituierten[2]) Aminosäuren, z. B. von Phenylglykokoll, im Harn die den Aminosäuren zugehörigen Ketosäuren auftreten. Ferner fand er, daß die Ketosäuren sich im Stoffwechsel den Aminosäuren ähnlicher verhalten als die entsprechenden Oxysäuren. Daraus schloß er, daß die Desaminierung der Aminosäuren im allgemeinen unter Oxydation des Aminosäurerestes zur Ketosäure erfolgt, nach dem Schema:

$$R{-}CH(NH_2){-}COOH + O = R{-}C:O{-}COOH + NH_3$$

Aminosäure + Sauerstoff = Ketosäure + Ammoniak.

Knoop[3]) zeigte, daß die Umkehrung des Abbaues, die Aminosäuresynthese in vivo und in vitro von den Ketosäuren und nicht von den Oxysäuren aus erfolgen kann, Versuche, die nicht nur zugunsten der allgemeinen Gültigkeit des oxydativen Weges sprechen, sondern auch den Mechanismus der Reaktion näher klärten.[3])

Eine direkte Überführung der Aminosäuren in die Ketosäuren im Tierkörper war bisher jedoch nur in wenigen Fällen möglich[1])[4]), nur bei den aromatischen Aminosäuren Phenylglykokoll, Phenylalanin, Tyrosin und einigen Derivaten dieser Aminosäuren. In allen Fällen fanden sich aber neben den Ketosäuren auch die Oxysäuren, und nicht immer ließ sich beweisen, daß

[1]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. **95**, 211 (1909); Hdb. d. norm. u. path. Phys. v. Bethe usw. **5**, 775 (1928).

[2]) Den Kunstgriff, phenylsubstituierte, körperfremde Derivate für physiologische Zwecke zu verwenden, hat F. Knoop zuerst angegeben. Hofmeisters Beitr. **6**, 150 (1905).

[3]) Zusammenfass. Darst.: Oxydationen im Tierkörper, Stuttgart 1931; ferner Diese Z. **148**, 294 (1925).

[4]) Kotake, mehrere Arb. in Diese Z. **122** (1923).

die gebildete Oxysäure nicht direkt, sondern erst durch sekundäre Reaktionen aus der Ketosäure entstanden war. Daher ist die Frage, ob es neben der oxydativen Desaminierung noch eine hydrolytische Desaminierung gibt, noch immer Gegenstand der Erörterung.[1])

Wir prüfen im folgenden die Frage der oxydativen Desamiaminierung der Aminosäuren durch drei verschiedene Versuchsreihen.

1. Desaminierung unter anaeroben Bedingungen. Wir untersuchen zuerst, ob tierische Gewebe imstande sind, bei Ausschluß von Sauerstoff, unter anaeroben Bedingungen, Aminosäuren zu desaminieren. Als Gewebe benutzen wir die Niere der Ratte, dasjenige Gewebe, das in Gegenwart von Sauerstoff die größte Desaminierungsgeschwindigkeit besitzt. Als Versuchsgefäße dienen kegelförmige Gefäße mit zwei Ansatzbirnen von der Form der Fig. 2, wie sie W. Cremer[2]) beschrieben hat. Der

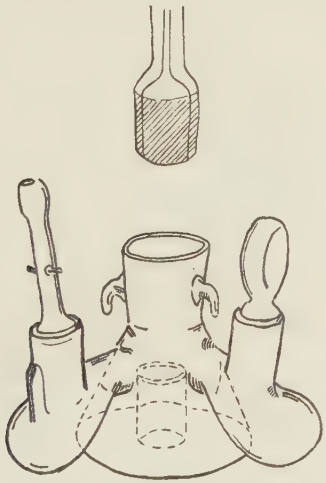


Fig. 2.
Versuchsgefäß mit 2 Anhängen nach W. Cremer.

Hauptraum des Gefäßes enthält den Gewebeschnitt und 2,5 ccm der Versuchslösung (Bicarbonatkonzentration m/20). Birne 1 enthält die Aminosäure mit 0,3 ccm Versuchslösung, Birne 2 0,2 ccm n-Salzsäure; der Gasraum wird mit 5 Vol.-% Kohlensäure (in praktisch sauerstofffreiem) Argon gefüllt. Zunächst wird das Gefäß 15 Minuten im Thermostaten bewegt. In dieser Zeit

[1]) Kotake, mehrere Arb. in Diese Z. **122** (1923).
[2]) Biochem. Z. **206**, 228 (1929).

werden vom Gewebe die letzten verunreinigenden Sauerstoffspuren absorbiert.[1]) Erst dann wird aus der Birne die Aminosäure zum Gewebe hinzugegeben. Nach einer Versuchszeit von 1 Stunde wird der Stoffwechsel durch Zugabe der Salzsäure aus der Birne 2 unterbrochen; das Gefäß wird geöffnet und das Gewebe in das Wägeglas übertragen. Die Versuchslösung wird eisgekühlt und sobald als möglich auf Ammoniak analysiert. Die Ergebnisse sind in der Tab. 11 zusammengestellt.

Tabelle 11.

Ammoniakbildung aus Aminosäuren (m/20) unter anaeroben Bedingungen in Rattenniere.

Zugefügte Aminosäure	mg Niere	In 75 Min. gebildetes NH_3 (cmm)	Anaerob Q_{NH_3} ohne Aminosäure (im Kontrollversuch)	Anaerob Q_{NH_3} mit Aminosäure	Aerob Q_{NH_3} nach Tabelle 5 u. 6
Glykokoll	6,39	6,48	2,18	0,81	4,34
d,l-Alanin	8,40	18,5	1,70	1,76	25,8
d,l,α-Aminobuttersäure	12,64	16,4	1,70	1,04	17,2
d,l-Valin	10,79	13,4	1,70	1,00	(57,6)
d,l-Leucin	9,14	14,2	1,70	1,24	(34,7)
d,l-Norleucin	10,94	16,2	1,70	1,19	60,7
d-Isoleucin	5,17	14,0	2,18	2,17	3,24
d-Ornithin	5,44	12,1	2,18	1,78	6,00
d-Lysin	5,80	14,7	2,18	2,03	4,42
d,l-Serin	15,88	16,8	1,70	0,85	11,8
d,l-Asparaginsäure . .	6,24	11,7	2,18	1,50	15,3
d-Glutaminsäure . . .	5,82	11,7	2,18	1,61	9,06
d,l-Phenylalanin . . .	8,17	13,6	1,70	1,34	77,0
l-Tyrosin	11,50	17,3	1,62	1,20	4,34
d,l-Prolin	7,12	13,1	1,62	1,47	4,48
l-Oxyprolin	8,15	18,8	1,62	1,84	5,52
l-Tryptophan	8,71	19,3	1,62	1,77	4,46
l-Histidin	5,87	13,9	1,62	1,89	3,18

Man ersieht, daß die Niere anaerob schon ohne Zusatz von Aminosäuren Ammoniak abgibt, und zwar nicht sehr viel weniger als unter aeroben Bedingungen. Diese „spontane“ anaerobe Ammoniakbildung ist schon von Warburg[3]), von Holmes[4]) und

[1]) Weißer Phosphor ist als Sauerstoffabsorptionsmittel für quantitative Versuche mit Ammoniak ungeeignet, ebenso wie die saure Chromchlorürlösung nach Negelein.[2]) Beide Absorptionsmittel absorbieren Ammoniak.

[2]) E. Negelein, Biochem. Z. **242**, 175 (1931).

[3]) Warburg, Posener u. Negelein, Biochem. Z. **152**, 309 (1925).

[4]) Patey u. Holmes, Biochem. J. **24**, 1564 (1930).

anderen gefunden worden. Zu den bisher bekannten anaeroben Ammoniakquellen in der Niere gehören die Adenylsäure (Embden und Schumacher) und das Asparagin (vgl. Abschnitt IX).

Während aber unter aeroben Bedingungen nach Aminosäurezusatz eine Mehrbildung von Ammoniak bis auf das 30fache auftritt (vgl. letzte Spalte der Tab. 11), finde ich unter anaeroben Bedingungen nach Zusatz von Aminosäuren keine Mehrbildung, die außerhalb der Fehlergrenzen der Methode liegt. Es folgt daraus, daß die Desaminierung der Aminosäuren in der Niere an die Gegenwart von Sauerstoff gebunden ist. Ich ziehe aus dieser Tatsache den Schluß, daß es im Tierkörper praktisch nur eine oxydative Desaminierung der Aminosäuren gibt.

Zur Prüfung der Frage, ob der molekulare Sauerstoff durch andere Wasserstoffacceptoren ersetzt werden kann, habe ich die Desaminierung unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Methylenblau, Chinon, Hämin, Alloxan untersucht, aber keine vermehrte Ammoniakbildung nach Zusatz dieser Stoffe gefunden.

In meinen ersten Versuchen glaubte ich auch bei strengster Anaerobiose eine Desaminierung gefunden zu haben. Es stellte sich aber heraus, daß die gefundene Desaminierung erst nach der Herausnahme des Gewebes aus der Lösung stattfindet. Überraschenderweise gibt die Niere an die Versuchslösung in großen Mengen ein Ferment ab, das molekularen Sauerstoff auf Aminosäuren überträgt und sie in Ammoniak und Ketosäure zerlegt, worauf ich später zurückkomme. Zur Prüfung der Desaminierung unter anaeroben Bedingungen ist es daher nötig, das Ferment vor dem Luftzutritt zur Lösung unwirksam zu machen, was in unserer Versuchsanordnung durch Ansäuern mit Salzsäure erreicht wird.

Histidase. Eine nicht-oxydative Ammoniakabspaltung aus Aminosäuren fand Edlbacher beim Histidin. Die Leber vieler Säugetiere enthält nach Edlbacher ein Ferment („Histidase"), das aus Histidin hydrolytisch Ammoniak bildet. Doch scheint es, daß hierbei das Ammoniak aus dem Imidazolring des Histidins stammt, nicht aus der freien α-Aminogruppe.

2. Verhältnis von Sauerstoffverbrauch zur Ammoniakbildung. Die vorangehenden Versuche zeigen, daß der nach Gleichung (2) zur oxydativen Desaminierung erforderliche Sauerstoff überwiegend der Sauerstoff der Atmung ist. Dies vorausgesetzt, dürfen nach Gleichung (2) pro Molekül veratmeten Sauerstoffs im Höchstfalle 2 Moleküle Ammoniak erscheinen. Vergleichen wir die Ammoniakbildung mit dem Sauerstoffverbrauch, so finden wir (Tab. 1—3), daß im allgemeinen der Sauerstoffverbrauch viel größer ist, als nach Gleichung (2) für die Desaminierung nötig wäre (da außer der Desaminierung noch andere Oxydationen in der Zelle vor sich gehen). Vergiften wir aber die Zelle mit Blausäure (Tab. 13), so verschwinden die anderen Oxydationen fast vollständig

und das Verhältnis von Sauerstoffverbrauch zur Ammoniakbildung nähert sich dem für die oxydative Desaminierung erwarteten Verhältnis 1:2. Dasselbe finden wir (Tab. 13) nach Vergiftung mit arseniger Säure und bei der „Atmung" im Nierenextrakt (Tab. 17). Niemals aber wird das Verhältnis $\frac{\text{Sauerstoffverbrauch}}{\text{Ammoniakbildung}}$ größer als 2. Es ergibt sich wiederum kein Anhalt für die Existenz einer nichtoxydativen Desaminierung von Aminosäuren.

3. Überführung der Aminosäuren in Ketosäuren. Wir haben 3 verschiedene Versuchsanordnungen gefunden, in denen man durch Nierengewebe aus α-Aminosäuren entsprechend der Gleichung (2) die Ketosäuren erhält. Während bisher der Übergang von Aminosäuren in Ketosäuren nur bei den 3 aromatischen Aminosäuren und Phenylglykokoll, Phenylalanin und Tyrosin — und einigen Derivaten dieser Aminosäuren — nachgewiesen war[1]), ist mit den neuen Anordnungen auch die Überführung der aliphatischen α-Aminosäuren in die Ketosäuren möglich.

1. Anordnung. Wir gehen bei der Anordnung der Versuche von der Tatsache aus, daß Ketosäuren Substanzen sind, die zum Teil von tierischen Geweben mit großer Geschwindigkeit zerstört werden können. Fügt man beispielsweise Brenztraubensäure zu Nierengewebe der Ratte hinzu, so beseitigt das Gewebe unter Anstieg der Sauerstoffatmung in einer Stunde mehr als 10% des Eigengewichtes an Brenztraubensäure (Tab. 12).

Tabelle 12.

Brenztraubensäureverbrauch in Rattenniere.

Niere mg	Brenztraubensäuremenge in der Lösung (cmm)		Brenztraubensäureverbrauch pro mg Gewebe und Stunde (cmm)	Sauerstoffverbrauch pro mg und Stunde (cmm)
	zu Beginn	nach 2,5 Stdn.		
6,32	736	317	26,3	38,0

Will man die bei der Desaminierung des Alanins erwartete Brenztraubensäure nachweisen, so muß man zuerst die weitere Umsetzung der gebildeten Brenztraubensäure in der Zelle verhindern. Wir haben daher nach Bedingungen gesucht, unter denen der Verbrauch der Brenztraubensäure aufgehoben, ihre Bildung aber noch erhalten ist.

[1]) Vgl. Neubauer, a. a. O., S. 210; Kotake, a. a. O., S. 210. Ferner Shambaugh, Lewis und Tourtellotte, J. of biol. Chem. **92**, 499 (1932).

Tabelle 13.

Desaminierung von d,l-Alanin in Gegenwart von Blausäure und arseniger Säure in Rattenniere.

Versuchslösung		$Q_{\text{Amino-N}}$	Q_{NH_3}	Q_{O_2}
1. Ohne Alanin	a) ohne Blausäure	—	+ 0,91	− 21,0
	b) $2 \cdot 10^{-3}$ HCN	—	+ 0,88	− 0,8
2. $1{,}13 \cdot 10^{-2}$ m d,l-Alanin	a) ohne Zusatz	− 14,7	+ 9,5	− 39,0
	b) $2 \cdot 10^{-3}$ m HCN	− 12,3	+ 12,8	− 7,0
	c) $1 \cdot 10^{-3}$ m As_2O_3	− 11,7	+ 10,1	− 8,6

Tabelle 14.

Hemmung der Ammoniakbildung aus Valin durch Blausäure (m/25-l-Valin, bicarbonathaltige Salzlösung, c_{NaHCO_3} = m/20, Gas 5% CO_2 in O_2, 37,5°.

Blausäure-konzentration	mg Niere	In 1 Stunde gebildetes NH_3 (cmm)	Q_{NH_3}	% Hemmung durch HCN
0	1,52	149	98	—
m/500	1,20	103	96	2
m/100	1,07	78,5	73,5	25

1. Methode. Die gesuchten Bedingungen finden wir erfüllt, wenn wir Niere mit Blausäure oder arseniger Säure vergiften. m/500-Blausäure oder m/1000-arsenige Säure hemmen die Atmung in Gegenwart von Alanin verhältnismäßig wenig und beeinflussen die Desaminierung nicht wesentlich (Tab. 13—14). Die gleichen Konzentrationen an Blausäure oder arseniger Säure hemmen aber den Verbrauch an Brenztraubensäure in der Niere fast vollständig (Tab. 15).

Tabelle 15.

Hemmung des Brenztraubensäureverbrauchs in Rattenniere durch arsenige Säure.

Konzentration an As_2O_3	Brenztraubensäureverbrauch pro mg Gewebe und Stunde (cmm)
0	− 26,3
10^{-3} m	− 0,66

Während normale überlebende Niere weder in Gegenwart von Traubenzucker noch von Milchsäure oder von Alanin meßbare Mengen Brenztraubensäure abgibt, liefert sie nach Vergiftung mit Blausäure oder arseniger Säure, wie erwartet, aus Alanin große Mengen Brenztraubensäure (nicht aber aus Glucose).

Nach Vergiftung mit Blausäure finde ich immer weniger Brenztraubensäure als nach Vergiftung mit arseniger Säure. Blausäure besitzt eine unerwünschte Nebeneigenschaft: sie bewirkt, daß sich Brenztraubensäure in der Lösung — schon außerhalb der Zelle — in ein Dimeres, in Para-Brenztraubensäure umlagert. Durch diese Nebenreaktion geht immer ein Teil der aus Alanin gebildeten Brenztraubensäure verloren. Arsenige Säure ist daher das geeignetere Gift. In Gegenwart von arseniger Säure finden wir innerhalb der Meßgenauigkeit das verschwundene Alanin quantitativ als Brenztraubensäure wieder (Tab. 16).

Tabelle 16.

Brenztraubensäurebildung aus Alanin in der Niere nach Vergiftung mit arseniger Säure (mit der Carboxylasemethode bestimmt.)

Versuchslösung	Q_{O_2}	Q_{NH_3}	$Q_{\text{Amino-N}}$	$Q_{\text{Brenztraubensäure}}$
1. 0,2% Glucose, ohne Alanin . .	−18,7	+ 2,67	—	0
2. wie 1., aber mit 10^{-3} m As_2O_3	− 3,2	+ 1,65	—	0
3. 0,2% Glucose, $1{,}13 \cdot 10^{-2}$ m d,l-Alanin	−43,2	+11,0	−15,3	0
4. wie 3., aber mit 10^{-3} m As_2O_3 .	− 8,6	+10,1	−11,7	+11,1

Isolierung der Brenztraubensäure. 100,6 mg Nierenschnitte der Ratte (Trockengewicht) wurden mit 50 ccm phosphathaltiger Salzlösung und 400 mg d,l-Alanin nach Zusatz von 0,8 ccm m/20-arseniger Säure 4 Stunden in Sauerstoffatmosphäre bei 37,5° bewegt. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die Schnitte aus der Lösung entfernt und gewaschen. Versuchslösung und Waschflüssigkeit wurden vereinigt (71 ccm) und mit 9 ccm 30%iger Trichloressigsäure versetzt. Das Filtrat (76 ccm) wurde langsam mit 14 ccm einer Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2 n-Salzsäure, die bei Zimmertemperatur gesättigt war, versetzt. Die Krystallisation des Hydrazons begann sofort. Nach 1 Stunde Eisschrankaufenthalt wurde der Niederschlag abzentrifugiert und auf der Zentrifuge je 1 mal mit m/4-Salzsäure und Wasser gewaschen. Der auf dem Glasfiltertiegel gesammelte und nochmals gründlich mit Wasser gewaschene Niederschlag wog nach dem Trocknen im Vakuum 84,78 mg. Das Hydrazon war schon nahezu rein, es schmolz bei 213° (unkorr.). Aus Essigester krystallisierte es in 6 eckigen Blättchen. Der Schmelzpunkt des umkrystallisierten Hydrazons lag, wie Neuberg[1]) angibt, bei 216° (unkorr.), ebenso wie derjenige des reinen Brenztraubensäure-2,4-Dinitrophenylhydrazons. Mischschmelzpunkt unverändert. Die Analyse ergibt:

3,540 mg Subst.: 5,27 mg CO_2, 0,86 mg H_2O.

$C_9H_8O_6N_4$ Ber. C 40,29 H 3,01
Gef. „ 40,60 „ 2,72.

2. Methode. Die gesuchten Bedingungen — Erhaltung der Ketosäurebildung, Hemmung der Ketosäurezerstörung — erhält

[1]) Biochem. Z. **219**, 490 (1930); **232**, 479 (1931).

man in sehr einfacher Weise, indem man die Zellstruktur zerstört. Zerreibt man Niere der Ratte im Mörser mit Sand und extrahiert man den Brei mit n/100-Phosphatpuffer von p_H 7,4, so erhält man nach Zentrifugieren opalescierende Flüssigkeiten, in denen Aminosäuren unter Sauerstoffaufnahme desaminiert werden, in denen aber die Desaminierungsprodukte — anders als in der lebenden Zelle — beständig sind und sich anhäufen. Der Nierenextrakt verbraucht bei Körpertemperatur in Sauerstoff von 1 Atm. Druck meistens nur Spuren von Sauerstoff. Nach Zusatz von Aminosäuren tritt ein großer Sauerstoffverbrauch auf; pro Molekül verbrauchten Sauerstoffs erscheinen 2 Mol. Ketosäure und 2 Mol. Ammoniak, wie nach Gleichung 2 zu erwarten ist. Wir geben folgendes Beispiel wieder: 10 g Schweineniere wurden mit 50 ccm m/100-Phosphatpuffer im Mörser mit Sand zerrieben. Dann wurde 20 Minuten zentrifugiert. Die überstehende trübe Flüssigkeit, mit 1 Volum Wasser verdünnt, diente als Versuchslösung. Je 2,5 ccm wurden mit 0,3 ccm (neutralisierter) Aminosäurelösung versetzt, so daß die Aminosäureendkonzentration m/20 betrug. Der Einsatz der Versuchsgefäße (nach Fig. 1) enthielt 0,2 ccm n-Natronlauge, der Gasraum Sauerstoff. Temperatur 37,5°. Versuchszeit 80 Minuten.

Die Ergebnisse enthält Tab. 17. Man ersieht, daß der Nierenextrakt die einfachen α-Aminosäuren mit großer Geschwindigkeit

Tabelle 17.

Oxydative Desaminierung von Aminosäuren in Nierenextrakt. (Anordnung vgl. Text.)

Zugefügte Aminosäure	O_2-Verbrauch (cmm)	O_2-Mehrverbrauch durch Aminosäurezusatz (cmm)	NH_3-Bildung (cmm)	NH_3-Mehrbildung durch Aminosäurezusatz (cmm)	Ketosäurebildung (cmm)	Ketosäuremehrbildung durch Aminosäurezus. (cmm)	$O_2 : NH_3$: Ketosäure
Ohne Zusatz . .	47	—	2,04	—	5	—	—
Glykokoll	61,4	14,4	21,4	1	5	—	—
d,l-Alanin . . .	309	262	529	509	485	480	1 : 1,94 : 1,83
d-Alanin	55	8	49	29	31	26	—
d,l-Valin	258	207	450	430	460	455	1 : 2,08 : 2,20
d,l-Leucin . . .	208	161	410	390	372	367	1 : 2,42 : 2,28
d,l-Norleucin . .	403	356	676	656	664	659	1 : 1,85 : 1,85
d,l-Phenylalanin	171	124	289	269	225	220	1 : 2,17 : 1,85
d,l-Serin	138	91	186	166	107	102	—

desaminiert. Der Nierenextrakt greift nicht mehr alle Aminosäuren an. Nach Zusatz von Diaminosäuren, Aminodicarbonsäuren, ferner von d- oder l-Histidin, l-Tryptophan, Prolin und Oxyprolin finde ich keine vermehrte Ammoniakbildung. Nur diejenigen Aminosäuren, welche im Gewebeschnitt besonders leicht desaminiert werden, werden im Extrakt noch angegriffen.

Das desaminierende Ferment der Niere geht auch ohne mechanische Zerstörung des Gewebes in Lösung, wenn man Nierenschnitte 1 Stunde in physiologischer Salzlösung bewegt, eine Tatsache, die methodisch wichtig ist. Ich führe folgendes Beispiel an. 11,34 mg Rattenniere wurden bei 37,5° in 2,5 ccm Salzlösung mit d,l-Alanin in Argon mit 5% Kohlensäure geschüttelt (Bicarbonat m/20). Nach 1 Stunde wurde das Gewebe herausgenommen und Sauerstoff mit 5% Kohlensäure in das Gefäß eingeleitet. Nach einer Ausgleichszeit von 10 Minuten wurde folgende Sauerstoffaufnahme gemessen:

Nach	20	Minuten	60,5	cmm
„	40	„	108	„
„	60	„	144	„
„	120	„	219	„
„	240	„	249	„

Der Gesamtsauerstoffverbrauch (einschließlich der Ausgleichszeit) ergibt sich durch Extrapolation zu 282 cmm. Die Lösung enthält ferner bei Schluß des Versuches 535 cmm Ammoniak und 555 cmm Ketosäure. Das Verhältnis von $O_2 : NH_3$: Ketosäure ist also 1 : 1,90 : 1,97.

Es läßt sich also aus der Niere ein Ferment (oder ein Fermentsystem) extrahieren, das Aminosäuren oxydativ nach Gleichung 2 desaminiert und das man daher als „Aminosäure-Oxydo-Desaminase“ bezeichnen kann. Die Oxydo-Desaminase ist in den Extrakten wenig beständig. Bei 37,5° verlieren die Extrakte innerhalb der ersten Versuchsstunden schon etwa 30—50% ihrer Wirksamkeit. Die Abtrennung des Fermentes von der Zellstruktur hat seinen schnellen Untergang zur Folge, ebenso wie wir es von den Fermenten der Atmung und Gärung kennen.

Wir finden das desaminierende Ferment allein in der Niere und — in viel geringerer Menge — in der Leber (vgl. Tab. 21), nicht in den übrigen Organen. Die Mehrzahl der Gewebe kann aus Aminosäuren, wie es scheint, nur in dem Maße Ammoniak bilden, in dem sie die Aminosäuren verbrennen kann. Denn wenn

man den Sauerstoffverbrauch mit der Ammoniakbildung in den Geweben vergleicht (Tabelle 1, 2), so findet man, daß weniger Ammoniak erscheint, als der vollständigen Verbrennung der zugesetzten Aminosäuren entspricht. Nur in der Niere und in der Leber ist ein besonderer Mechanismus vorhanden, durch den Aminosäuren spezifisch desaminiert werden können. Pro Molekül verbrauchten Sauerstoffs erscheinen hier unter geeigneten Versuchsbedingungen bis zu 2 Mol. Ammoniak. Niere und Leber entwickeln aus Aminosäuren Ammoniak, ohne sie vollständig zu verbrennen.

3. Methode. Während Brenztraubensäure aus Alanin im Gewebeschnitt erst nach Vergiftung mit Blausäure oder arseniger Säure auftritt, gehen andere Aminosäuren in Nierenschnitten schon ohne Zusatz von Giften bilanzmäßig in die Ketosäuren über. In vielen Fällen verläuft — anders wie beim Alanin — die Desaminierung schneller als die weitere Umsetzung der Ketosäure, so daß sich die Ketosäuren in der Lösung anhäufen. Vom Phenylalanin war dieses Verhalten zu erwarten, da aus den Versuchen von Kotake (a. a. O. S. 210) und anderen[1]) schon bekannt war, daß auch der Gesamtorganismus nach reichlicher Verfütterung von Phenylalanin im Harn Phenylbrenztraubensäure ausscheidet. Wir finden auch in einer Reihe von aliphatischen Aminosäuren eine Ketosäurebildung im nicht vergifteten Gewebe, wie folgende Versuche zeigen.

α-Ketobuttersäure aus d,l-α-Aminobuttersäure. Einen Versuch, in dem die Ketosäurebildung manometrisch gemessen wurde, gibt Tab. 18 wieder. Der Bildung von 15,3 cmm Ammoniak (pro Milligramm Gewebe und Stunde) entspricht schon ohne arsenige Säure eine Ketosäurebildung von 11,8 cmm. Betrachtet man die Ammoniakbildung als Maß für die Desaminierung der Aminosäure, so wären 77% der desaminierten Aminosäure als Ketosäure wiedergefunden. Nach Vergiftung mit m/1000-arseniger Säure steigt die Ketosäurebildung noch an und wird innerhalb der Meßfehler der Ammoniakbildung äquivalent. In der vergifteten Zelle wird also die umgesetzte Aminosäure nahezu quantitativ in die Ketosäure übergeführt.

Die Isolierung der α-Ketobuttersäure geschah in folgendem Ansatz: 300 mg d,l-α-Aminobuttersäure wurden mit 50 ccm Phosphatsalzlösung, 0,25 ccm m/20-arseniger Säure und 131,7 mg Rattenniere (Trockengewicht)

[1]) Vgl. Neubauer, a. a. O. S. 210; Kotake, a. a. O. S. 210. Ferner Shambaugh, Lewis u. Tourtellotte a. a. O. S. 214.

Tabelle 18.

Ketosäurebildung aus d,l-α-Aminobuttersäure.
Versuchslösung: Phosphatsalzlösung. 37,5°. Gas O_2. Zeit 2 Stunden.

mg Niere (Ratte)	Versuchslösung (2,5 ccm)	Q_{O_2}	Gebildetes Ammoniak (cmm)	Q_{NH_3}	Gebildete Ketosäure (cmm)	$Q_{Ketosäure}$
5,57	m/100-d,l-α-Aminobuttersäure ohne As_2O_3	19,2	171	15,3	131	11,8
6,97	m/100-d,l-α-Aminobuttersäure m/4000-As_2O_3	14,6	286	20,5	217	15,6
5,99	m/100-d,l-α-Aminobuttersäure m/1000-As_2O_3	12,4	175,5	14,6	182	15,2

4 Stunden bei 37,5° in Sauerstoffatmosphäre bewegt (Gefäß nach Fig. 1). Nach 4 Stunden wurden Versuchslösung und Waschflüssigkeit (71 ccm) mit 9 ccm 30%iger Trichloressigsäure enteiweißt. Das Filtrat (76 ccm) wurde mit 15 ccm 2,4-Dinitro-phenylhydrazon-Lösung (gesättigt bei Zimmertemperatur in 2 n-Salzsäure) versetzt, worauf sofort ein citronengelber Niederschlag fiel. Er wurde nach 1 Stunde (Eisschrank) abzentrifugiert, auf der Zentrifuge mit 10 ccm m/4-Salzsäure und mit Wasser gewaschen und auf dem Glasfiltertiegel gesammelt. Er wog 124,17 mg und schmolz bei 195° (unkorr.). Essigester krystallisiert das Hydrazon in langen, citronengelben Nadeln, die konstant bei 203,5° (unkorr.) schmelzen.

Die Analyse ergibt:

3,896 mg Subst.: 6,11 mg CO_2, 1,24 mg H_2O.

$C_{10}H_{10}O_6N_4$ Ber. C 42,54 H 3,57 Gef. C 42,77 H 3,56.

Dimethyl-brenztraubensäure aus d,l-Valin. Beim d,l-Valin finden wir ähnliche Verhältnisse wie bei der α-Aminobuttersäure. Ohne Zusatz von arseniger Säure werden, wie die Tab. 19 zeigt, schon 57% der desaminierten Aminosäure als Ketosäure wiedergefunden (gemessen an der Ammoniakbildung). Nach Zusatz von m-/4000arseniger Säure steigt die Ausbeute auf praktisch 100% an.

Die Isolierung der Dimethyl-brenztraubensäure wurde in ähnlicher Weise wie die Isolierung der α-Ketobuttersäure durchgeführt. Mit Hilfe von 163,5 mg Niere wurde 114,3 mg Rohprodukt des Hydrazons erhalten (Schmelzp. 194,5°). Nach Umkrystallisieren aus Essigester Schmelzp. 195° (unkorr.). Die Analyse ergibt:

3,621 mg Subst.: 5,97 mg CO_2, 1,25 mg H_2O.

$C_{11}H_{12}O_6N_4$ Ber. C 44,58 H 4,08 Gef. C 44,96 H 3,86.

Tabelle 19.

Ketosäurebildung aus d,l-Valin in Phosphatsalzlösung, 37,5°, O_2. Versuchszeit 2 Stunden.

mg Niere (Ratte)	Versuchslösung (2,5 ccm)	Q_{O_2}	Gebildetes Ammoniak (cmm)	Q_{NH_3}	Gebildete Ketosäure (cmm)	$Q_{Ketosäure}$
9,35	m/100-d,l-Valin	−32,0	168	9,00	78	+4,17
9,58	m/100-d,l-Valin + m/4000-As_2O_3	−31,1	221	11,5	187	+9,8
6,41	Ohne Valin	−18,5	21,1	1,65	0	0

α-Ketocapronsäure aus d,l-α-Amino-capronsäure (Norleucin). Beim Norleucin erscheinen ohne Vergiftung 78% des abgegebenen Ammoniaks an Ketosäure, in Gegenwart von m/1600-arseniger Säure 96%, wie Tab. 20 zeigt. Zur Isolierung der Ketosäure wurden 519 mg (Trockengewicht) Schnitte von Schweineniere mit 65 ccm Phosphat-Salzlösung, 0,2 ccm m/20-arseniger Säure und 400 mg d,l-α-Amino-n-capronsäure angesetzt und 4 Stunden in Sauerstoffatmosphäre bei 37,5° bewegt. Ausbeute an Rohprodukt: 126,7 mg Hydrazon Schmelzp. 147—148° unkorr. Nach Umkrystallisieren aus Alkohol-Wasser Schmelzp. 148° (unkorr.). Analyse:

3,577 mg Subst.: 6,18 mg CO_2, 1,35 mg H_2O.

$C_{12}H_{14}O_6N_4$ Ber. C 46,44 H 4,55 Gef. C 46,51 H 4,22.

Tabelle 20.

Ketosäurebildung aus d,l-α-Amino-n-capronsäure (d,l-Norleucin). (Bedingungen wie Tab. 19).

mg Niere	Versuchslösung (2,5 ccm)	Gebildetes Ammoniak (cmm)	Q_{NH_3}	Gebildete Ketosäure (cmm)	$Q_{Ketosäure}$
10,94	m/50-d,l-Norleucin	330	15,1	258	11,8
10,77	m/50-d,l-Norleucin + m/1600-As_2O_3	432	20,0	413	19,2

α-Keto-iso-capronsäure aus d,l-Leucin. Einen Versuch, in dem die Ketosäurebildung aus Leucin manometrisch gemessen wurde, gibt Tab. 21 wieder. Die Isolierung der Ketosäure geschah in folgendem Ansatz: 50 ccm m/20-d,l-Leucin wurden in Phosphat-Salzlösung nach Zusatz von 0,2 ccm m/20-As_2O_3 mit 115,8 mg Rattenniere in Sauerstoff bei 37,5° bewegt. Nach 3 Stunden wurde das Gewebe aus der Lösung entfernt. 48 ccm wurden mit 3 ccm 30%iger Trichloressigsäure enteiweißt. 48 ccm Filtrat gaben nach Zusatz von 20 ccm 2,4-Dinitrophenyl-hydrazin einen eigelben Niederschlag, der 50,30 mg wiegt. Schmelzpunkt nach Umkrystallisieren aus Alkohol-Wasser 155° (unkorr.). Die Analyse ergibt:

3,260 mg Subst.: 5,60 mg CO_2, 1,32 mg H_2O.

$C_{12}H_{14}O_6N_4$ Ber. C 46,44 H 4,55 Gef. C 46,84 H 4,53.

Tabelle 21.

Bildung von α-Keto-iso-capronsäure aus d,l-Leucin in Rattenniere und Rattenleber. Versuchslösung: je 2,5 ccm Phosphatlösung mit m/20-d,l-Leucin pro Gefäß. Gas: O_2; 37,5 Grad; Zeit: 2 Stunden.

Zusatz zur Versuchslösung (Endkonzentration)	mg Gewebe	verbrauchter O_2 (cmm)	Q_{O_2}	Gebildetes NH_3 (bei Leber einschl. Harnstoff)	Q_{NH_3}	Gebildete Ketosäure (manometr. gemessen)	$Q_{Ketosäure}$
—	3,80 mg Niere	−209	−27,5	158	20,8	150	19,7
m/5000-As_2O_3	8,65 mg Niere	−255	−14,7	300	17,3	310	17,9
m/1000-As_2O_3	10,85 mg Niere	−353	−16,3	516	23,7	518	23,8
—	16,14 mg Leber	−399	−12,3	165	5,12	85	2,63
m/5000-As_2O_3	19,14 mg Leber	−195	− 5,1	203	5,30	144	3,75

Phenylbrenztraubensäure aus d,l-Phenylalanin. Die Ausbeute an Phenylbrenztraubensäure wird durch Vergiftung mit arseniger Säure nicht vergrößert. Zur Isolierung der Phenylbrenztraubensäure wurden 666,5 mg (Trockengewicht) Schnitte von Schweineniere mit 500 mg d,l-Phenylalanin in 80 ccm Phosphat-Salzlösung bei 37,5° in Sauerstoff gehalten. Nach 4 Stunden gab eine Probe der Lösung im Ätherextrakt eine intensive Eisenchloridreaktion, die für Phenylbrenztraubensäure charakteristisch ist.[1]) Ausbeute an Rohprodukt des Dinitrophenyl-hydrazons 164,94 mg. Schmelzpunkt 188—189°.

Schweineniere, die gleichzeitig ebenso, jedoch ohne Zusatz von Aminosäure behandelt war, ergab keinen Niederschlag mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin.

Das Phenyl-brenztraubensäure-2,4-dinitro-phenyl-hydrazon löst sich leicht in heißem Alhohol. Nach Zusatz des gleichen Volumens Wasser krystallisiert es in orangegelben, zu Büscheln angeordneten Nadeln, die bei 188—189° (unkorr.) schmelzen.

Die Analyse ergibt:

3,724 mg Subst.: 7,04 mg CO_2, 1,20 mg H_2O.

$C_{15}H_{12}O_6N_4$ Ber. C 52,31 H 3,60 Gef. C 51,56 H 3,52.

IX. Ammoniakbildung aus Asparagin.

Verschieden von der Desaminierung der Aminosäuren ist die Abspaltung der Amidgruppe aus dem Säureamid-Asparagin. Die Desaminierung der Aminosäuren ist, wie wir sahen, mit der Oxydation des Aminosäurerestes verbunden. Die Abspaltung der Säureamidgruppe dagegen erfolgt hydrolytisch nach der Gleichung:

[1]) Meyer-Jacobsen, Lehrb. d. org. Chem. II, 223.

$$COOH \cdot CHNH_2 \cdot CH_2 \cdot CONH_2 + H_2O = COOH \cdot CHNH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH + NH_3 \quad (3)$$

Die Reaktion (3) wird durch ein Ferment katalysiert, das S. Lang[1]) im Jahre 1904 entdeckt hat, und das Asparaginase genannt wird. Asparaginase findet sich in vielen tierischen Geweben, besonders in Leber und Niere. Die Wirkung des Fermentes ist weder an die Intaktheit der Zellstruktur, noch an die Anwesenheit von Sauerstoff gebunden; unter streng anaeroben Bedingungen finden wir die gleiche Ammoniakabspaltung wie unter anaeroben Bedingungen.

Die Frage, ob sich Glutamin ebenso wie Asparagin verhält, ist bisher nicht genauer untersucht worden (vgl. Geddes und Hunter).

X. Quelle des Harnammoniaks.

Nash und Benedikt[2]) zeigten im Jahre 1921, daß der Hauptanteil des Ammoniaks in der Niere selbst gebildet wird. Sie fanden, daß das zugeführte Blut in der Niere kein Ammoniak abgibt, sondern sogar Ammoniak aufnimmt. Die Nierenvene übertrifft an Ammoniak die Nierenarterie um ein Mehrfaches. Darum kann das Harnammoniak nicht aus dem Blute stammen, das der Niere zufließt.

Nachdem so bewiesen war, daß die Niere das Ammoniak bildet, entstand die Frage, aus welchen Stoffen die Niere das Ammoniak gewinnt. Bisher war die Frage nach dieser „Ammoniakmuttersubstanz" nicht befriedigend zu beantworten. Nash und Benedikt[2]) und später Bollmann und Mann[3]) vermuteten im Harnstoff die Vorstufe des Harnammoniaks. Bollmann und Mann[3]) führen zur Begründung an, daß in ihren Versuchen an entleberten Hunden die Ammoniakausscheidung im Harn mit der Abnahme des Harnstoffs im Blut absank und nach intravenöser Injektion von Harnstoff wieder anstieg.

Wir haben unter vielfacher Veränderung unserer Versuchsbedingungen die Frage der Ammoniakbildung aus Harnstoff in der Niere geprüft. Aber weder unter physiologischen Bedingungen, noch bei Änderung der Wasserstoffionenkonzentration oder der Bicarbonatkonzentration, noch bei Verwendung von Serum als

---

[1]) Hofmeisters Beitr. **5**, 321 (1904); vgl. ferner v. Fürth u. Friedmann, Biochem. Z. **26**, 435 (1910); Maeda, ebenda **143**, 342 (1924); Dieter, Diese Z. **120**, 281 (1922); A. Clementi, Arch. farmacol. sper. **41**, 241 (1926) und Arch. Scient. biolog. **13**, 443 (1929); Geddes u. Hunter, J. of biol. Chem. **77**, 197 (1928); Grassmann u. Mayr, Diese Z. **214**, 185 (1933).

[2]) J. of biol. Chem. **48**, 463 (1921); **51**, 514 (1921); **69**, 381 (1926); **82**, 673 (1930); **94**, 783 (1932).

[3]) Amer. J. Physiol. **92**, 92 (1930).

Versuchslösung, noch nach Zusatz von Acetessigsäure oder β-Oxybuttersäure haben wir eine Ammoniakbildung aus Harnstoff gefunden. Wir schließen daraus, daß Harnstoff nicht zu den Ammoniakmuttersubstanzen in der Niere der Säuger gehört.[1])

Der von Bollmann und Mann angegebene Versuch darf daher nicht in der Weise erklärt werden, daß man annimmt, Harnstoff sei die Quelle des Harnammoniaks.

Adenylsäure spaltet zwar, wie Embden und Schuhmacher[2]) fanden, in der Niere Ammoniak ab, doch reicht die Ammoniakbildung aus Adenylsäure nicht aus, um die Gesamtammoniakbildung zu erklären.

Nach den vorangehenden Abschnitten sind die Aminosäuren in der Niere Ammoniakmuttersubstanzen. Untersuchen wir die Frage, ob die Geschwindigkeit der Desaminierung von Aminosäuren allein ausreicht, die im Harn vorkommenden Ammoniakmengen zu erklären, so legen wir der Berechnung die Messungen an der menschlichen Niere zugrunde. Die menschlichen Nieren scheiden pro Stunde normalerweise etwa 10—40 mg Ammoniak aus. Unter pathologischen Bedingungen — in der diabetischen Acidose — steigen die stündlichen Ammoniakmengen auf 50 bis 200 mg. Nach Tab. 22 kann menschliche Niere aus Aminosäuren pro mg Trockengewicht und Stunde bis zu 5 cmm = 0,0038 mg Ammoniak bilden. Setzen wir das Gesamttrockengewicht der menschlichen Niere zu 60 g, so ergibt sich eine maximale Ammoniakbildung von 230 mg pro Stunde. Die Ammoniakbildung aus Aminosäuren reicht also aus, sogar die hohen Ammoniakwerte in den Harnen acidotischer Zuckerkranker zu erklären. Daher können wir annehmen, daß die Aminosäuren die Hauptquelle des Harnammoniaks sind.

Obgleich an diese naheliegende Möglichkeit schon oft gedacht wurde — zuerst von Nash und Benedikt, später von Bornstein und Budelmann[3]) und von Patey und Holmes[4]) —, und obgleich Bornstein und Budelmann sowie Patey und Holmes[4]) schon gezeigt hatten, daß die Niere aus Glykokoll Ammoniak abspaltet, so war doch bisher mangels quantitativer Messungen die Frage unentschieden, in welchem Maße Aminosäuren an der Ammoniakbildung in der Niere beteiligt sind.

---

[1]) Vgl. hierzu Rehberg, Brandt und Blem, Pflügers Arch. **230**, 689 und 697 (1932).

[2]) Pflügers Arch. **223**, 487 (1929). [3]) Biochem. Z. **218**, 64 (1930).

[4]) Biochemic. J. **24**, 1564 (1930).

XI. Bedeutung des Harnammoniaks.

Die Ammoniakausscheidung in der Niere dient, wie schon vor längerer Zeit Naunyns Schule[1]) und später Münzer[2]), Hasselbalch[3]) und Henderson[4]) erkannt haben, der Regulierung des Säuren- und Basenhaushalts im Organismus. Kreisen im Blute nicht flüchtige Säuren, die der Körper nicht verwerten kann — sei es infolge vermehrter Säurezufuhr, sei es, wie im Diabetes mellitus, infolge vermehrter Säurebildung —, so ist es Aufgabe der Nieren, die überschüssigen Säuren auszuscheiden. Im Blute kreisen die auszuscheidenden Säuren, soweit ihre Dissoziationskonstante größer als 10^{-8} ist, vorwiegend in ionisierter Form als Natriumsalze. Im Harn erscheinen die Säuren, wenn ihre Dissoziationskonstante auch den Wert 10^{-5} übersteigt, ebenfalls vorwiegend in ionisierter Form, aber nicht mehr als Natriumsalze, sondern als Ammoniumsalze. In der Niere wird das Natriumion gegen das Ammoniumion ausgetauscht. Der Sinn dieser Reaktion ist die Einsparung von Natriumionen, d. h. von indifferenten Kationen. Ammoniak ist wegen seiner großen Giftigkeit im Blut als Neutralisator unbrauchbar. Durch den Austausch des Natriums gegen Ammonium bei der Ausscheidung der Säuren kann aber der Körper Natrium mit Hilfe von Ammoniak einsparen. 1 Natriumion kann so nacheinander viele Säureäquivalente auf dem Wege bis zur Niere neutralisieren.

XII. Acidose der Nierenkranken.

Krankhafte Störungen der Ammoniakausscheidung kennen wir seit den Arbeiten von Henderson und Palmer[5]), van Slyke[6]), Rabinowitsch[7]) und Magnus-Levy[8]) bei Nierenkrankheiten, die zur Niereninsuffizienz führen. Im Stadium der Niereninsuffizienz sinken die Ammoniakwerte im menschlichen Harn auf Bruchteile des Normalen.

Die Frage, warum in der Niereninsuffizienz das Harnammoniak fehlt — ob infolge mangelhafter Ausscheidung oder infolge mangelhafter Bildung in der Niere — war bisher noch offen.

---

[1]) Hallervorden, Arch. f. exper. Path. **12**, 237 (1880); Stadelmann, ebenda, **17**, 419 (1883); Minkowski, ebenda, **18**, 37 (1884).
[2]) Biochem. Z. **71**, 255 (1915). [3]) Biochem. Z. **74**, 16 (1915).
[4]) Henderson u. Palmer, J. of biol. Chem. **21**, 35 (1915).
[5]) J. clin Investig. **2**, 255 (1926). [6]) J. of biol. Chem. **21**, 35 (1915).
[7]) Arch. int. Med. **33**, 392 (1928).
[8]) Z. klin. Med. **107**, 197 (1928).

Ich habe die Ammoniakbildung aus Aminosäuren in verschiedenen menschlichen Nieren, die wegen Tuberkulose exstirpiert waren, untersucht. In solchen Nieren, in denen die pathologischen Veränderungen auf kleine Herde beschränkt waren und in denen Nierenteile untersucht werden konnten, die von den kranken Herden entfernt lagen, finde ich eine viel größere Ammoniakbildung als in den (histologisch gesunden) Teilen solcher Nieren, in denen die krankhaften Herde sehr ausgedehnt waren, und bei denen die klinische Untersuchung Funktionsstörungen zeigte (Tab. 22). Die Niere verliert also, wenn sie erkrankt, die Fähigkeit, Aminosäuren mit genügender Geschwindigkeit zu desaminieren. Das Fehlen des Harnammoniaks in der Niereninsuffizienz ist nicht die Folge des Versagens der sekretorischen Leistungen der Niere, sondern — zumindest teilweise — Folge des Erlahmens der chemischen Leistungen.

Tabelle 22.

Ammoniakbildung in menschlicher Niere (Operationsmaterial). Versuchslösung: Physiologische Salzlösung mit m/40-$NaHCO_3$, m/50-Aminosäure. Niere I—III zeigten nur kleine umschriebene tuberkulöse Herde, Niere IV, V und VI zeigten ausgedehnte Veränderungen.

Aminosäuren	Niere I Q_{NH_3}	Niere II Q_{NH_3}	Niere III Q_{NH_3}	Niere IV Q_{NH_3}	Niere V Q_{NH_3}	Niere VI Q_{NH_3}
ohne Zusatz . .	0,89	0,47	1,27	1,06	0,64	0,50
d-Valin	1,50	1,64	—	—	—	0,89
l-Valin	1,44	2,18	—	—	—	0,88
d-Leucin . . .	1,93	—	—	(d,l) 2,08	—	0,89
l-Leucin	2,10	—	—		—	1,10
l-Asparaginsäure	5,06	5,68	4,55	4,37	3,22	1,16
d-Glutaminsäure	4,75	—	—	2,79	—	0,86
d-Phenylalanin .	—	6,03	—	1,75	1,28	—
l-Phenylalanin .	—	1,65	—	1,75	—	—
d-Lysin . . .	1,95	—	—	1,50	—	0,55
d-Alanin . . .	—	—	4,21	—	—	—

Diese Störung der Nierenfunktion ist für den Gesamtorganismus von Bedeutung. Ist die Niere nicht mehr in der Lage, Ammoniak für die Neutralisierung der Säuren — von denen es scheint, daß sie bei Niereninsuffizienz vermehrt im Blute vorkommen (Becher[1]) — zur Verfügung zu stellen, so müssen die Säuren bei der Ausscheidung als Natriumsalze den Körper verlassen. Die Folge ist, daß der Körper sein Alkali verliert; das an Bicarbonat gebundene

[1]) Becher, Enger und Herrmann, Klin. Wschr. 11, 891 (1932).

Alkali sinkt auf einen Bruchteil der Norm und der niereninsuffiziente Organismus verfällt in die lebensbedrohende „Acidose".

Es war zwar noch unentschieden, ob die urämische Acidose — wie Magnus-Levy meint — allein auf Mangel an Ammoniak in der Niere beruht, oder ob — wie Volhard[1]) und Becher[2]) meinen — eine abnorme Säurebildung mitbeteiligt ist. Doch zweifeln wir nach Hendersons, van Slykes und Magnus-Levys Untersuchungen nicht daran, daß der Mangel an Ammoniak die wesentlichste Ursache für die Enstehung der urämischen Acidose ist, und daß es keine urämische Acidose gibt, solange die Ammoniakbildung in der Niere normal ist.

XIII. Zusammenfassung.

Die Untersuchung des Stoffwechsels der Aminosäuren in überlebenden Gewebeschnitten führte zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Niere ist — neben der Leber — einer der Hauptorte der Desaminierung der Aminosäuren. Die Aminosäuren sind die wesentlichsten Quellen des Harnammoniaks. — Die Ammoniakbildung in der Niere ist für die Regulierung des Säuren–Basengleichgewichtes notwendig. Störungen der Ammoniakbildung führen zur Acidose. Die urämische Acidose ist nicht die Folge einer mangelhaften Nierensekretion, sondern in erster Linie Folge mangelhafter Stoffwechselleistungen der Niere, der mangelhaften Desaminierung von Aminosäuren.

2. Eine Reihe von optisch aktiven nichtnatürlichen Aminosäuren (l-Alanin, l-Valin, d-Leucin, d-Phenylalanin, d-Histidin) wird in der Niere der Ratte (10 bis 20 mal) schneller desaminiert als die entsprechenden optisch natürlichen Formen.

3. Die Desaminierung der α-Aminosäuren verläuft praktisch quantitativ auf dem von Neubauer und von Knoop aufgefundenen oxydativen Wege, unter Bildung von Ketosäuren. Die Niere enthält ein Ferment, das α-Aminosäuren mit Hilfe von molekularem Sauerstoff in α-Ketosäuren überführt. Es wird die Überführung der Aminosäuren in die Ketosäuren für eine Reihe von Fällen beschrieben (Alanin $\rightarrow$ Brenztraubensäure, α-Aminobuttersäure $\rightarrow$ α-Ketobuttersäure, Phenylalanin $\rightarrow$ Phenylbrenztraubensäure, Leucin $\rightarrow$ α-Keto-isocapronsäure, Norleucin $\rightarrow$ α-Keto-n-capronsäure). Für die anderen Aminosäuren (Aminodicarbonsäuren, Diaminosäuren und Glykokoll) wird der oxydative Abbauweg durch die Tatsache bewiesen, daß die Desaminierung an die Anwesenheit von Sauerstoff gebunden ist und unter anaeroben Bedingungen aufhört.

[1]) Handb. d. inn. Med. v. Mohr-Staehelin, 2. Aufl., Bd. VI, 761.
[2]) Vgl. Anmerkung 1, S. 226.